Keyi Ando Ussami

**Ensaio cometa em microalgas marinhas:
danos no DNA de *Dunaliella tertiolecta* Butcher 1959
causados pela exposição à 4-nitroquinolina-N-óxido e
ao benzo[a]pireno**

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

Orientador: Prof. Dr. Phan Van Ngan

São Paulo

- 2007 -

Universidade de São Paulo
Instituto Oceanográfico

Ensaio cometa em microalgas marinhas:
danos no DNA de *Dunaliella tertiolecta* Butcher 1959 causados
pela exposição à 4-nitroquinolina-N-óxido e ao benzo[a]pireno

Keyi Ando Ussami

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

Julgada em ____/____/____ por

Prof. Dr. Phan Van Ngan
Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo

conceito

Prof (a). Dr (a).

conceito

Prof (a) Dr (a).

conceito

*Dedico este trabalho àqueles que sabem que até mesmo as pequeninas coisas podem
fazer grandes diferenças.*

Agradecimentos

Meus sinceros agradecimentos....

... ao Prof. Phan, pela orientação, por tudo que me ensinou na pesquisa, por todas as oportunidades oferecidas, pelas idéias materializadas de “prof. Pardal” e pela amizade;

... ao Prof. Vicente, pelas conversas atenciosas e amizade;

... à Zezé, nossa outra mãe, pelo acompanhamento cuidadoso nos meus primeiros passos dentro de um laboratório;

.... aos membros e ex-membros do laboratório de Ecofisiologia, que contribuíram para que a cada dia que passasse, a pesquisa no laboratório caminhasse um pouco mais para a frente: Fabio G., Roberta, Tita, Felipe, Cássia, Natali, Lucas, Hermínio, Natássia, Divaldo, Viviany, Fernando, Fernanda, Thaís Ribas, Maysa e Kate. Agradecimentos especiais à Thaís, por ter sido para mim um modelo de aluna a ser seguido, por todas as coisas que me ensinou, pelas discussões científicas, e claro, o mais importante, pela amizade; à Carol e à Deca, pela amizade e por viverem o mestrado ao mesmo momento que eu, de forma que pudemos ensinar e aprender juntas durante nossas conversas; ao Arthur, pelos ensinamentos em trabalho de campo antártico; à Rosária, pelas discussões sobre o projeto de mestrado e pela amizade; e ao Fabio M. por seguir meus passos e ser o segundo a estudar microalgas no laboratório.

O trabalho com microalgas no laboratório de Ecofisiologia foi totalmente inédito, e eu não conseguiria chegar ao meu atual entendimento das pequeninas se não fosse o auxílio das pessoas que trabalham com fitoplâncton no IO. Agradeço imensamente...

... à Profa. Sônia Giancesella, pela oportunidade oferecida pelo PAE em que pude aprender muito sobre o fitoplâncton, pelo empréstimo do *quantameter*, e por me proporcionar o primeiro embarque no Besnard;

.... à Marta Stephan, pela preparação dos meios de cultura, por me ensinar as práticas de cultivo, por sempre me ajudar a resolver os problemas relativos ao cultivo de microalgas, pelo esforço em manter o Laboratório de Microorganismos Marinhos do IOUSP e pela amizade;

... ao Juan Alba, por tudo que me ensinou sobre microscopia de epifluorescência, pelo embarque em Iguape e por sempre tentar me ajudar a resolver os problemas;

... e à Flávia Saldanha-Corrêa, pelos ensinamentos na contagem do fitoplâncton, e pelas dicas na curva de crescimento e nomenclatura.

Na realização do ensaio cometa, agradeço...

... à MSc. Miriam Suzuki (Centro de Biotecnologia do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, CB/IPEN), por me ajudar em absolutamente tudo que precisei nas colorações e análises com brometo de etídio, pelo seu tempo dedicado a mim em todas as vezes que fui ao IPEN e pela amizade;

.... à Dra. Kayo Okazaki (CB/IPEN) por todo o material necessário para coloração com brometo de etídio;

... à Dra. Olga Higa (CB/IPEN), por ter permitido que eu usasse o microscópio de epifluorescência com o sistema de captura de imagem sempre que precisei;

... e à Dra. Eliana Nakano e à Dra. Toshie Kawano (Instituto Butantan) por terem me mostrado o caminho para o microscópio de epifluorescência;

... ao Prof. Paulo Sumida, por permitir o uso de sua máquina de fazer gelo e pelas conversas;

... ao Tomás, pela preparação dos meios de cultura na ausência da Marta, por tentar resolver os problemas dos outros como se fossem seus e ainda lidar com tudo isso de bom humor;

... ao Dr. Siegfried Knasmüller (Medical University of Vienna) pelas sugestões para o meu projeto;

... à Veronika Ehrlich, à Betina, ao Zé David e à Márcia pelas dicas de ensaio cometa.

Eu não poderia deixar de citar o auxílio que veio na forma de financiamento e estrutura para a execução deste trabalho. Agradeço...

... principalmente aos contribuintes, que através de impostos investem nas universidades e na pesquisa;

... à Pró-Reitoria de Pós-Graduação, pelo auxílio concedido para participação no Plankton Symposium IV;

... à CAPES, pela bolsa de mestrado;

... ao Programa de Aperfeiçoamento ao Ensino, pelas bolsas de monitoria;

... e ao CNPq, pela aprovação do projeto ao qual meu mestrado está vinculado, e sem o qual não haveria como comprar os materiais e reagentes necessários.

Às vezes as atividades realizadas durante o mestrado não tinham muita relação com o projeto em si. Mas também gostaria de agradecer ...

... ao Prof. Dr. Daniel Lemos, pela oportunidade oferecida pelo PAE;

... à turma III de Oceanografia, de quem tive o prazer de ser monitora durante duas disciplinas. Aprendi bastante com vocês, e espero ter podido compartilhar meus conhecimentos também;

... ao Prof. Joseph e à Profa. Ana Vanin, que tornaram possível a realização do curso de difusão cultural nas bases de Cananéia e Ubatuba. Agradeço também ao Prof. Mario, à Profa. Bete, ao Prof. Vicente e ao Prof. Paulo, pelos materiais emprestados; e à Edna, à Letícia e aos funcionários das bases. E agradeço a todo o pessoal que me acompanhou neste projeto, principalmente Thaís, Marquinhos, Caio, Cris, Alessandro, Ricardo, Marlos, Leo Santi e Zedu.

Pelo dia a dia na USP, agradeço...

... aos funcionários do IO, que dentro de suas respectivas atribuições, prontamente auxiliaram naquilo que podiam: Valter na informática; Luis no lab; Silvana e Ana Paula na secretaria de pós; Marlene, Mirian e Dona Cida na secretaria do DOB; Trini, Cidinha e Dona Ruth na lavagem de vidrarias; Claudinha, Cidinha e principalmente Dona Rai na biblioteca; Jorge no assuntos administrativos e depois acadêmicos;

... ao pessoal do laboratório PROFITO e do laboratório de Dinâmica Bêntica, visitados muitas vezes durante o mestrado;

.... ao Arthur por tentar resolver meu problema da centrífuga;

... ao Rafa e ao Caio, pela consultoria química;

... às “vizinhas” Sandra, Gabi (e pequena Valentina!), pela companhia durante os experimentos feitos durante as noites e finais de semana;

... à Cíntia Organo, por ter me apresentado o BioStat e o SigmaPlot;

... ao Marcos pelas conversas sobre ciência e por sempre me encorajar na pesquisa;

... aos amigos do IO, pela companhia durante os almoços, cafês, terças em dobro, corridas e baladinhas... mais uma vez Thaís, Deca, Carol e Fabio G., mas também Juan, as duas Cíntias, as duas Paulinhas, Cacá, Nati, Marquinhos e Déia;

... à Didi e ao Bertão, pelas contas penduradas;

... aos amigos antárticos... em especial Sosô, Edilson, Marcelão, Mia, Laps, João, Daniel, Cris, Edgard, Sandrinha, Profa. Rosane, Prof. Anelli;

... aos amigos da Biologia, pelos papos de biólogo... em especial à Vivi, Cássia e Gaio.

E fora da USP, agradeço...

... ao Pai Chi Nan, por ter me enviado do Japão o artigo de Nakahara et al. (1957), e ao Eyri Watari, por ter tentado;

... ao Xoiu e ao Sady pela hospitalidade em Piracicaba, e à Mioko e ao Rosas, pela hospitalidade em João Pessoa, lugares visitados por causa de congressos/cursos;

... aos meus pais, pela importância que dão ao estudo e por serem pessoas maravilhosas, que vivem uma vida sempre em busca de um mundo melhor. Por terem ensinado o certo não só através de palavras, mas também através de atitudes;

... às minhas irmãs, Minne e Linn, por terem convivido com meu estresse e cansaço principalmente na fase final, por terem compreendido e terem sido companheiras sempre;

... ao Julio, que esteve do meu lado em todos os sentidos. Nas questões técnicas, por ter criado o programa ImageConverter Comet, por ter me ajudado a resolver todos os problemas de computador, por ter ajudado até mesmo na análise de cometas segundo o ID, nas referências e na correção do texto. Por ser alguém com quem posso falar de qualquer coisa, a qualquer momento. Mas mais importante, por ter sido meu companheiro desde o início, me encorajando e me levando para frente sempre;

... à Dona Neusa pelo colo;

... aos amigos da infância e adolescência, por ouvirem (quase) sempre todas as coisas super interessantes do mundo da ciência que quero compartilhar, por serem amigos para qualquer hora! Agradecimentos especiais à Ná, Ski e Eric, pelo fervilhão de pensamentos compartilhados, e ao Seung, por se interessar e ler sobre um assunto tão diferente de sua formação e me dar algumas dicas na escrita;

... e às pessoas que esqueci de citar, mas que passaram pela minha vida e que contribuíram para o que sou hoje.

Muito obrigada pela energia de todos vocês.

Índice

Agradecimentos	ii
Índice	vi
Lista de tabelas	viii
Lista de figuras	ix
Lista de abreviaturas, fórmulas, siglas e símbolos	xiii
Lista de espécies de microalgas citadas.....	xv
Resumo	xvii
Abstract.....	xviii
1. Introdução.....	1
2. Objetivos.....	8
2.1. Objetivo geral	8
2.2. Objetivos específicos.....	8
3. Materiais e métodos.....	9
3.1. Organismos utilizados e condições de cultivo.....	9
3.2. Reagentes.....	12
3.3. Exposição à 4NQO	12
3.4. Exposição ao BAP	13
3.5. Viabilidade	14
3.6. Ensaio cometa.....	15

3.7.	Análise estatística e apresentação dos resultados	19
3.8.	Estabelecimento de condições experimentais.....	20
4.	Resultados.....	25
4.1.	Estabelecimento de condições experimentais.....	25
4.2.	Exposição à 4NQO	27
4.3.	Exposição ao BAP	29
5.	Discussão	31
5.1.	Estabelecimento de condições experimentais.....	31
5.2.	Exposição à 4NQO	38
5.3.	Exposição ao BAP	48
5.4.	Microalgas como organismos teste no ensaio cometa.....	51
6.	Conclusões.....	53
7.	Bibliografia.....	55
8.	Anexo 1 – Tabelas	67
9.	Anexo 2 – Figuras	71
10.	Anexo 3 – Preparo de soluções.....	98

Lista de tabelas

Tabela I - Resumo de testes de lise de oito espécies de algas em solução de lise alcalina iônica (SLAI) e solução de lise salina aniônica (SLSA).	67
Tabela II – Frequência de células móveis (%) após 1 h de exposição a 0,5 mM de H ₂ O ₂ no escuro. Células usadas para o estabelecimento de voltagem para eletroforese.	68
Tabela III - Frequência de células móveis (%) após 1 h de exposição a diferentes concentrações de 4NQO (μM) no escuro. I e II são réplicas.....	68
Tabela IV - Índices de dano de cometas de <i>D. tertiolecta</i> após exposição a diferentes concentrações de 4NQO por 1 h, analisados nas lâminas coradas com BrEt e prata. Resultados do Experimento 1.	68
Tabela V - Frequência de células móveis (%) após 1, 2 e 4 h de exposição a diferentes concentrações de 4NQO (nM) no escuro. Os pares I e II, III e IV, V e VI são réplicas.	69
Tabela VI - Índice de dano de cometas de <i>D. tertiolecta</i> após exposição a diferentes concentrações de 4NQO por 1, 2 e 4 h. Resultados do Experimento 2. Coloração: BrEt.	69
Tabela VII - Frequência de células móveis (%) após 1, 2 e 4 h de exposição a diferentes concentrações de BAP (μM) no escuro.	69
Tabela VIII - Índice de dano de cometas de <i>D. tertiolecta</i> após exposição a diferentes concentrações de BAP por 1, 2 e 4 h. Coloração: BrEt.....	70

Lista de figuras

Figura 1 – <i>Dunaliella tertiolecta</i> cepa CF1. Barra = 10 µm.	71
Figura 2 – <i>D. tertiolecta</i> mantidas em meio de cultura Guillard “f/2” na incubadora do Banco de Microorganismos Marinhos do IOUSP.	71
Figura 3 - Teste de lise com <i>Chlorella minutissima</i> . 1 a 3: coradas com Giemsa. 4 a 6: coradas com Nitrato de Prata. 1: Controle, sem lise. 2: 2h de SLAI. 3: 4h de SLSA. 4: Controle, sem lise. 5: 2h de SLAI. 6: 4h de SLSA. As algas desta espécie não apresentaram lise celular em nenhuma das condições testadas. Além disso, o tamanho reduzido de <i>C. minutissima</i> dificulta o trabalho pois pode ser confundido com sujeira, comum na coloração com Nitrato de Prata (4,5,6). Barra = 10µm.	72
Figura 4 - Teste de lise com Cryptophyceae. 1 a 3: coradas com Giemsa. 4 a 6: coradas com Nitrato de Prata. 1: Controle, sem lise. 2: 5 min. na SLAI. 3: 1h na SLSA. 4: Controle, sem lise. 5: 5 min. na SLAI. 6: 1h na SLSA. As algas deste grupo apresentaram lise celular facilmente, com apenas 5min. na SLAI (fotos 2 e 5), e 1h na SLSA (fotos 3 e 6). Barra = 10µm.	73
Figura 5 - Teste de lise com <i>Dunaliella tertiolecta</i> . 1 a 3: coradas com Giemsa. 4 a 6: coradas com Nitrato de Prata. 1: Controle, sem lise. 2: 5 min. na SLAI. 3: 1h na SLSA. 4: Controle, sem lise. 5: 5 min. na SLAI. 6: 1h na SLSA. As algas desta espécie apresentaram lise celular facilmente, com apenas 5min. na SLAI (fotos 2 e 5) e 1h na SLSA (fotos 3 e 6). Barra = 10µm.	74
Figura 6 - Teste de lise com <i>Hillea</i> sp. 1 a 3: coradas com Giemsa. 4 a 6: coradas com Nitrato de Prata. 1: Controle, sem lise. 2: 2h na SLAI. 3: 4h na SLSA. 4: Controle, sem lise. 5: 2h na SLAI. 6: 4h na SLSA. As algas deste grupo não apresentaram lise celular em nenhuma das condições testadas. Barra = 10µm.	75
Figura 7 - Teste de lise com <i>Ochromonas</i> sp. 1 a 3: coradas com Giemsa. 4 a 6: coradas com Nitrato de Prata. 1: Controle, sem lise. 2: 2h na SLAI. 3: 4h na SLSA. 4: Controle, sem lise. 5: 2h na SLAI. 6: 4h na SLSA. As algas deste grupo não apresentaram lise celular em nenhuma das condições testadas. Barra = 10µm.	76

Figura 8 - Teste de lise com *Tetraselmis alacris*. 1 a 3: coradas com Giemsa. 4 a 6: coradas com Nitrato de Prata. 1: Controle, sem lise. 2: 2h na SLAI. 3: 4h na SLSA. 4: Controle, sem lise. 5: 2h na SLAI. 6: 4h na SLSA. As algas desta espécie não apresentaram lise celular em nenhuma das condições testadas. Barra = 10µm. 77

Figura 9 - Teste de lise com *Tetraselmis* sp. 1 e 2: coradas com Giemsa. 3 e 4: coradas com Nitrato de Prata. 1: Controle, sem lise. 2: 4h na SLSA. 3: Controle, sem lise. 4: 4h na SLSA. Barra = 10µm 78

Figura 10 - Teste de lise com *Tetraselmis* sp., coradas com Nitrato de Prata. 1: Controle, sem lise. 2: 5 min. na SLAI. 3: 2 h na SLAI. As algas desta espécie apresentaram lise celular parcial em todas as condições testadas de SLAI (5 min. a 2 h). Barra = 10µm. 78

Figura 11 - Teste de lise com *Tetraselmis gracilis*. 1 e 2: coradas com Giemsa. 3 e 4: coradas com Nitrato de Prata. 1: Controle, sem lise. 2: 4h na SLSA. 3: Controle, sem lise. 4: 4h na SLSA. Barra = 10µm. 79

Figura 12 - Teste de lise com *Tetraselmis gracilis*, coradas com Nitrato de Prata. 1: Controle, sem lise. 2: 5 min. na SLAI. 3: 2 h na SLAI. As algas desta espécie apresentaram lise celular parcial em todas as condições testadas de SLAI (5 min. a 2 h). Barra = 10µm..... 79

Figura 13 - Curva de crescimento de *D. tertiolecta* cultivada na sala de cultura, meio A. A linha azul representa o período característico de crescimento exponencial (fase log). 80

Figura 14 - Curva de crescimento de *D. tertiolecta* cultivada na incubadora, meio B-1. A seta indica o início da fase exponencial de crescimento..... 80

Figura 15 – Curva de crescimento de *D. tertiolecta* cultivada na incubadora, meio B-2. A seta indica o início da fase exponencial de crescimento..... 81

Figura 16 - Curva de crescimento de *D. tertiolecta* cultivada na incubadora, meio B-3. A seta indica o início da fase exponencial de crescimento..... 81

Figura 17 – Frequência (%) de microalgas *D. tertiolecta* móveis após 1, 2 ou 4 h de exposição a diferentes concentrações de H₂O₂ no escuro. As médias são representadas

pelas barras e os desvios padrão são representados pelas suíças. Tratamentos significativamente diferentes do controle com o mesmo tempo de exposição são representados por * ($p < 0,01$). 82

Figura 18 - Variação no Índice de Danos de cometa de *D. tertiolecta* em função de voltagem aplicada na eletroforese. Exposições em condições controle e 0,5 mM H_2O_2 por 1 h no escuro. 83

Figura 19 - Frequência (%) de microalgas *D. tertiolecta* móveis após 1, 2 ou 4 h de exposição a diferentes concentrações de 4NQO no escuro. As médias são representadas pelas barras e os desvios padrão são representados pelas suíças. Tratamentos significativamente diferentes do solvente com o mesmo tempo de exposição são representados por * ($p < 0,01$) e + ($p < 0,05$). 84

Figura 20 – Classificação de classes de danos em cometas de *D. tertiolecta*. Coloração: BrEt. Barra = 10 μ m. Nota-se que o cometa classe 4, também chamado de *ghost*, não possui cabeça definida. 85

Figura 21 – Classificação de classes de danos em cometas de *D. tertiolecta*. Coloração: prata. Exposição a 4NQO. Barra = 10 μ m. Nota-se que o cometa classe 4, também chamado de *ghost*, não possui cabeça definida. 86

Figura 22 - Momento de cauda e comprimento de cauda de *D. tertiolecta* expostas a diferentes concentrações de 4NQO por 1 h no 87

Figura 23 - Comprimento da cauda de *D. tertiolecta* expostas a diferentes concentrações de 4NQO por 1 h no Experimento 1. I e II são réplicas. Réplica I corada com Brometo de Etídio (I-BrEt) e posteriormente com prata (I-prata); e réplica II corada com Brometo de Etídio (II-BrEt) e posteriormente com prata (II-prata). a, b: significativamente diferente do controle e do solvente, respectivamente ($p < 0,05$). 88

Figura 24 - Número de células de *D. tertiolecta* encontradas em cada classe de dano após exposição a diferentes concentrações de 4NQO por 1 h (I e II) . Resultados do Experimento 1, em réplica. Coloração: BrEt. 89

Figura 25 - Número de células de <i>D. tertiolecta</i> encontradas em cada classe de dano após exposição a diferentes concentrações de 4NQO por 1 h (I e II) . Resultados do Experimento 1, em réplica. Coloração: prata.	90
Figura 26 - Momento de cauda de <i>D. tertiolecta</i> expostas a diferentes concentrações de 4NQO no Experimento 2. Exposições por 1 h (I e II são réplicas), 2 h (III e IV são réplicas) e 4 h (V e VI são réplicas). Coloração: BrEt. a, b: significativamente diferente do controle e do solvente, respectivamente ($p < 0,05$).	91
Figura 27 - Número de células de <i>D. tertiolecta</i> encontradas em cada classe de dano após exposição a diferentes concentrações de 4NQO por 1 h (I e II) . Resultados do Experimento 2, em réplica. Coloração: BrEt.	92
Figura 28 - Número de células de <i>D. tertiolecta</i> encontradas em cada classe de dano após exposição a diferentes concentrações de 4NQO por 2 h (III e IV) . Resultados do Experimento 2, em réplica. Coloração: BrEt.	93
Figura 29 - Número de células de <i>D. tertiolecta</i> encontradas em cada classe de dano após exposição a diferentes concentrações de 4NQO por 4 h (V e VI) . Resultados do Experimento 2, em réplica. Coloração: BrEt.	94
Figura 30 – Correlação de momento de cauda, comprimento da cauda e porcentagem de DNA na cauda <i>versus</i> ID. Dados obtidos dos experimentos 1 e 2 de exposição de <i>D. tertiolecta</i> a diferentes concentrações de 4NQO. Regressões obtidas considerando todos os dados (A-1 a A-3). Regressões obtidas após exclusão dos dados de lâminas com excesso de <i>ghosts</i> (exposições a 0,5 e 1 μ M de 4NQO) (B-1 a B-3).	95
Figura 31 - Momento de cauda de <i>D. tertiolecta</i> exposta a diferentes concentrações de BAP por 1, 2 e 4 h. Coloração: BrEt. a, b: significativamente diferente do controle e do solvente, respectivamente ($p < 0,05$).	96
Figura 32 - Número de células de <i>D. tertiolecta</i> encontradas em cada classe de dano após exposição a diferentes concentrações de BAP por 1, 2 e 4 h. Coloração: BrEt.	97

Lista de abreviaturas, fórmulas, siglas e símbolos

~ - aproximadamente

4NQO – 4-nitroquinolina-N-óxido

APHA – *American Public Health Association*

ASTM – *American Society for Testing and Materials*

BAP – benzo[a]pireno

BPDE – *benzo[a]pyrene 7,8-diol-9,10-epoxide*

BrEt – brometo de etídio

CAS - *Chemical Abstracts Service*

CENO - concentração de efeito não observável (NOEC – *non-observed effect concentration*) (maior concentração nominal do agente químico que não causa efeito deletério estatisticamente significativo nos organismos, durante determinado tempo de exposição, nas condições de teste)

CI50 – concentração de inibição (concentração do agente tóxico que causa inibição, por exemplo na reprodução ou crescimento, a 50% dos organismos-teste em relação ao controle, durante determinado tempo de exposição, nas condições do teste)

DAPI – dicloreto de 4,6-diamino-2-fenil-indol

DDT – 1,1,1-tricloro-2,2-bis(*p*-clorofenil)etano)

dH₂O – água destilada

DMF – dimetilformamida

DMSO - dimetil-sulfóxido

DSS – dodecil sulfato de sódio

ERO – espécies reativas de oxigênio

HPA – hidrocarboneto policíclico aromático

ID – índice de danos (ref. ao cometa)

LMP - baixo ponto de fusão (*low-melting point*), refere-se à agarose

mA – miliampère

NDCN – *nondetectable cell nuclei*

NMP - ponto de fusão normal (*normal melting point*), refere-se à agarose

OECD – *Organization for Economic Cooperation and Development*

PBS – tampão fosfato salino (*phosphate saline buffer*)

PCBs – bifenilas policloradas

SCGE – *single cell gel electrophoresis*

SLAI - solução de lise alcalina iônica

SLSA - solução de lise salina aniônica

Sol. – solução

U.S. EPA – *United States Environmental Protection Agency*

V – volts

W – watts

YOYO-1 - *benzoxazolium-4-quinolinum oxazole yellow homodimer*

Lista de espécies de microalgas citadas

Abaixo se encontram listadas em ordem alfabética as espécies de microalgas citadas ao longo do texto, com a sua respectiva divisão e classe.

Anabaena flos-aquae - Cyanobacteria, Cyanophyceae

Ankistrodesmus braunii – Chlorophyta, Trebouxiophyceae

Caulerpa taxifolia – Chlorophyta, Bryopsidophyceae

Chaetoceros tenuissimus – Bacillariophyta, Coscinodiscophyceae

Chlamydomonas reinhardtii – Chlorophyta, Chlorophyceae

Chlorella minutissima – Chlorophyta, Trebouxiophyceae

Chlorella vulgaris - Chlorophyta, Trebouxiophyceae

Closterium ehrenbergii – Charophyta, Zygnematophyceae

Cryptophyceae – Cryptophyta, não corresponde a um gênero, e sim à classe
Cryptophyceae

Dunaliella bardawil - Chlorophyta, Chlorophyceae

Dunaliella marina - Chlorophyta, Chlorophyceae

Dunaliella salina - Chlorophyta, Chlorophyceae

Dunaliella tertiolecta - Chlorophyta, Chlorophyceae

Euglena gracilis – Euglenozoa, Euglenophyceae

Hillea sp. – Cryptophyta, Cryptophyceae

Microcystis aeruginosa – Cyanobacteria, Cyanophyceae

Monochrysis lutherii – Ochrophyta, Synurophyceae

Navicula pelliculosa – Bacillariophyta, Bacillariophyceae

Ochromonas malhanensis – Ochrophyta, Chrysophyceae

Ochromonas sp. – yellow green Chrysophyceae

Phaeodactylum tricornutum – Bacillariophyta, Bacillariophyceae

Pseudokirchneriella subcapitata - Chlorophyta, Chlorophyceae, anteriormente
denominada *Selenastrum capricornutum*

Rhodomonas sp. – Cryptophyta, Cryptophyceae

Scenedesmus acutus- green – Chlorophyta, Chlorophyceae

Scenedesmus quadricauda - Chlorophyta, Chlorophyceae

Scenedesmus subspicatus- Chlorophyta, Chlorophyceae

Selenastrum capricornutum – Chlorophyta, Chlorophyceae, atualmente denominada

Pseudokirchneriella subcapitata

Tetraselmis alacris- Chlorophyta, Prasinophyceae

Tetraselmis gracilis- Chlorophyta, Prasinophyceae

Tetraselmis suecia - Chlorophyta, Prasinophyceae

Thalassiosira pseudonana – Bacillariophyta, Coscinodiscophyceae

Resumo

Dunaliella tertiolecta, uma alga verde fitoplanctônica de ampla distribuição no ambiente marinho, foi escolhida como organismo teste para estudar a possibilidade de ser utilizada no ensaio cometa, um teste de detecção de danos no DNA em células individualizadas muito utilizado na ecotoxicologia. Essas algas foram facilmente lisadas pela solução de lise alcalina iônica, seus cometas foram corados eficientemente pelo brometo de etídio e pela prata, e a análise por índice de danos apresentou boa correlação com momento de cauda, comprimento de cauda e porcentagem de DNA na cauda. As algas foram expostas a concentrações crescentes de 4-nitroquinolina-N-óxido (4NQO) e benzo[a]pireno (BAP) por 1, 2 e 4 h no escuro. Após somente 1 h de exposição, observou-se um aumento significativo de danos no DNA das algas expostas a 0,25 µM de 4NQO, demonstrando a sensibilidade das mesmas em relação a células de animais. Os dados obtidos da exposição ao BAP não foram consistentes e necessitam de verificação. A metabolização de BAP em compostos tóxicos pelas algas e o efeito das condições de luminosidade antes e durante as exposições são discutidos. Os resultados indicam que *D. tertiolecta* pode ser utilizada em laboratório para avaliação de genotoxicidade na água através do ensaio cometa.

Palavras-chave: ensaio cometa, microalgas, ecotoxicologia, danos no DNA, 4-nitroquinolina-N-óxido, benzo[a]pireno, coloração, índice de danos

Abstract

D. tertiolecta, a phytoplanktonic green algae with ubiquitous distribution in the marine environment, was chosen as a test organism to study the possibility of being used in the comet assay, a frequently used test in ecotoxicology to detect DNA damage in single cells. These algae were easily lysed by the alkaline ionic lysis solution, their comets were efficiently stained by ethidium bromide and silver and the damage index was well correlated to tail moment, tail length and percentage of DNA in the tail. The algae were exposed to increasing concentrations of 4-nitroquinoline-N-oxide (4NQO) and benzo[a]pyrene (BAP) for 1, 2 and 4 h in the dark. After 1 h exposure, a significant increase in the DNA damage of algae exposed to 0,25 μ M of 4NQO was observed, demonstrating their sensitivity in relation to cells from animals. The data of BAP exposure were not consistent and need further verification. The metabolism of BAP to toxic compounds by algae and the light conditions before and during exposure are discussed. The results indicate that *D. tertiolecta* can be used in laboratory to evaluate water genotoxicity with comet assay.

Keywords: comet assay, microalgae, ecotoxicology, DNA damage, 4-nitroquinoline-N-oxide, benzo[a]pyrene, staining, damage index

1. INTRODUÇÃO

Agentes físicos, como radiação solar ou raio-X, e uma variedade de compostos químicos, como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), bifenilas policloradas (PCBs) e metais pesados, podem danificar o DNA das células vivas (Lee & Steinert, 2003).

As substâncias carcinogênicas são classificadas em vários tipos. Os chamados carcinogênicos genotóxicos iniciam mudanças carcinogênicas interagindo diretamente com o DNA, o material genético da célula, causando mutações durante a divisão celular. O segundo grande grupo são os carcinogênicos não-genotóxicos. Essas substâncias não alteram o DNA diretamente, mas têm efeitos nas características de crescimento das células. Esses químicos acentuam o processo carcinogênico, mas não o iniciam. Eles freqüentemente causam alguma mudança no ambiente celular que intensifica a formação de tumor. Dois tipos particulares de carcinogênicos não-genotóxicos são os citotóxicos, como o clorofórmio, e análogos hormonais, como os supressores de tireóide. Para objetivos regulatórios, todas essas diferentes substâncias são tratadas como se fossem diretamente genotóxicas, sem reconhecimento dos seus diferentes mecanismos para produção de tumor (Andersen, 1991).

Se as lesões no DNA não forem reparadas, elas podem iniciar uma cascata de conseqüências biológicas no nível das células, dos órgãos, dos organismos, e finalmente das populações e comunidades. Os danos no DNA em uma variedade de organismos aquáticos estão associados à redução de crescimento, ao desenvolvimento anormal e à sobrevivência reduzida de embriões, larvas e adultos (Lee & Steinert, 2003). No nível de populações, pode ocorrer perda de diversidade genética, que terá sérias implicações na sobrevivência das espécies e no funcionamento do ecossistema (Bickham *et al.* 2000). Devido à possibilidade da implicação ecológica associada à genotoxicidade, a detecção e a quantificação de danos no DNA são de grande interesse nos estudos ambientais (Nacci *et al.*, 1996). Quebras de fita, bases modificadas e ligações cruzadas são exemplos de lesões no DNA produzidos por agentes químicos e físicos. As quebras na fita podem ser causadas diretamente por compostos genotóxicos, através da interação com radicais de oxigênio ou outros intermediários reativos, ou como uma conseqüência da excisão por enzimas de reparo (Lee & Steinert, 2003).

Dentre as diferentes técnicas utilizadas para detectar danos causados por substâncias genotóxicas, a eletroforese em gel de células individualizadas (em inglês, *single cell gel electrophoresis*, ou SCGE), também chamada de ensaio cometa (*comet assay*) vem sendo utilizada com sucesso em várias espécies de organismos, inclusive em humanos (Rojas *et al.*, 1999). Na versão mais utilizada do ensaio cometa, uma suspensão de células é misturada a uma agarose de baixo ponto de fusão dissolvida em um tampão. Essa mistura é colocada em uma lâmina de microscópio, criando assim um pequeno gel de agarose com células com seu DNA no interior. As células são lisadas por uma solução contendo detergente e alta concentração de sais, que rompe as membranas e remove o conteúdo celular, deixando na agarose nucleóides contendo alças superenroladas de DNA ligadas à matriz nuclear (Collins, 2004). O DNA permanece altamente enrolado na presença de proteínas não-histonas, mas quando são colocadas em uma solução alcalina ($\text{pH} > 13$), no chamado processo de relaxamento, ele começa a relaxar a partir de sítios com quebras nas fitas. O DNA passa então por uma eletroforese ($\text{pH} > 13$) e, após coloração, as células com mais danos no DNA apresentam maior migração deste a partir do núcleo em direção ao anodo, tendo a aparência de um cometa (Rojas *et al.*, 1999).

O ensaio cometa detecta um amplo espectro de danos no DNA (quebras nas fitas simples e duplas, sítios sensíveis a álcalis, sítios com reparação tardia) e está sendo cada vez mais utilizado como um teste de genotoxicidade *in vitro* e *in vivo* em uma grande variedade de organismos (Tice, 1995). As vantagens da técnica são: (1) os dados são coletados no nível de célula individual, (2) é necessário somente um pequeno número de células, (3) pode ser usada praticamente em qualquer população de células eucarióticas, (4) o ensaio é sensível, relativamente simples e de baixo custo, e (5) o ensaio pode avaliar os danos no DNA em células que não estão se proliferando (Rojas *et al.*, 1999). Devido ao desenho experimental único do ensaio cometa, é possível também determinar se todas as células dentro de uma população demonstram o mesmo grau de danos (Fairbairn *et al.*, 1995).

No meio aquático, o ensaio cometa já foi utilizado com microalgas (Aoyama *et al.*, 2003), anêmonas (Mitchelmore & Hyatt, 2004), bivalves (Rank & Jensen, 2003; Hartl *et al.*, 2004), poliquetas (Boeck & Kiesch-Volders, 1997), camarões (Hook & Lee, 2004), ouriços-do-mar (Taban *et al.*, 2004), tunicados (Kamer & Rinkevich, 2002), peixes (Akcha *et al.*, 2003) e cetáceos (Taddei *et al.*, 2001).

É amplamente reconhecido que um único bioensaio não pode ser usado para se avaliar os efeitos tóxicos de todos os diferentes modos de ação, pois nem todos os sítios alvos são encontrados em um único organismo. Portanto, quando se usa testes de toxicidade para avaliação e controle de descargas de efluentes, necessita-se de uma bateria de testes de metodologia. A avaliação dos impactos potenciais no corpo d'água em que o efluente está sendo descartado requer a inclusão de espécies representando diferentes níveis tróficos, tipicamente algas (produtores primários), invertebrados (consumidores primários) e peixes (consumidores secundários) (Johnson *et al.*, 2004). Recentemente tem havido o desenvolvimento de medidas regulatórias que recomendam testes de genotoxicidade em químicos e efluentes antes de sua liberação no ambiente. Essas medidas regulatórias recomendam normalmente testes *in vitro* ou usando bactérias. Estes testes são úteis para definir a genotoxicidade intrínseca de uma substância, porém uma avaliação de risco ecotoxicológico deve considerar também a atividade genotóxica expressa em organismos ecologicamente relevantes (Dixon *et al.*, 2002).

O fitoplâncton contribui para a produção de biomassa em sistemas aquáticos através da atividade fotossintética e, portanto, representa a base da cadeia alimentar. A diversidade e densidade dos organismos fitoplanctônicos podem indicar a qualidade do seu habitat pois estes organismos são de ciclo de vida curto, e respondem rapidamente a mudanças ambientais (Lewis, 1995). O fitoplâncton pode ser usado como indicador de eutrofização causada por descarga de efluentes (Parnell, 2003). Além disso, em casos em que a hidrodinâmica afeta a qualidade da água e a biologia das algas, bioensaios laboratoriais apresentam-se como ferramentas úteis para fornecer informações necessárias e complementares para criação de estratégias no manejo da qualidade da água (O'Farrel *et al.*, 2002). A maioria dos métodos de Ensaio de Toxicidade com algas são crônicos e baseados no método descrito em *Algal Assay Procedure Bottle Test* da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA). No Brasil, os testes com algas encontram-se normatizados pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT – NBR 12648). O princípio básico do ensaio é semelhante entre os diferentes métodos: uma cultura de alga em fase exponencial de crescimento é exposta, em condições estáticas, a diferentes concentrações de uma substância durante o período do teste. O efeito tóxico é avaliado através da biomassa produzida na amostra em relação ao controle. As espécies comumente utilizadas são: *Pseudokirchneriella subcapitata* (anteriormente denominada *Selenastrum capricornutum*), *Scenedesmus quadricauda*,

Scenedesmus subspicatus, *Chlorella vulgaris*, *Anabaena flos-aquae* e *Microcystis aeruginosa* (Aragão & Araújo, 2006). As quatro primeiras espécies citadas são Chlorophytas, e as duas últimas são Cyanophytas. Apesar da existência de um teste de toxicidade padronizado para algas, os pesquisadores continuam na busca para desenvolver ensaios biológicos de menor escala usando algas (Eisentraeger *et al.*, 2003). Alguns pesquisadores acreditam que testes com plantas são menos sensíveis que testes com animais (Lewis, 1995). Apesar disso, as algas têm se mostrado mais sensíveis que animais a várias substâncias tóxicas, uma prova da importância e da necessidade de realização desses testes em avaliações ecotoxicológicas (Aragão & Araújo, 2006). Miller e colaboradores (1985) compararam a toxicidade de metais pesados e herbicidas em algas, daphnídeos, bactérias, sementes de plantas e minhocas. Seus resultados mostraram que o grupo das algas foi o mais sensível à toxicidade dos metais pesados e o segundo mais sensível à toxicidade por herbicidas, sendo as sementes de plantas as mais sensíveis neste caso (*apud* Wang, 1991). Weyers & Vollmer (2000) compararam a sensibilidade dos testes de toxicidade com algas, peixes e *Daphnia*, e concluíram que mesmo com diferentes parâmetros (taxa de crescimento ou biomassa), os testes com algas são os mais sensíveis. Algumas espécies de algas encontram uso na avaliação da qualidade dos sistemas aquáticos, para os quais, inclusive, já foi sugerido um “índice de poluição” baseado nos gêneros de algas presentes: quanto menos diversificada a população, maior a poluição do sistema. Um outro aspecto da importância das algas na ecotoxicologia está relacionado à capacidade em retirar elementos químicos do meio aquoso, o que sugere a utilização de algumas espécies de algas na recuperação de sistemas aquáticos, em especial quanto à presença de íons metálicos e de alguns compostos orgânicos (Vidotti & Rollemberg, 2004; Adhiya *et al.*, 2002). As algas unicelulares também são usadas em testes de substâncias mutagênicas e antimutagênicas (Foltínová & Grones, 1997).

A pesquisa em diferentes níveis tróficos representa um importante aspecto do controle ecológico, quando se está avaliando o potencial genotóxico de águas de superfície. Apesar da importância ecológica das microalgas, e das evidências que elas podem detoxificar, ativar ou bioacumular compostos genotóxicos (Harwood *et al.*, 1989), poucos são os trabalhos que delas se utilizam para o estudo de genotoxicidade através do ensaio cometa. Erbes *et al.* (1997) foram os pioneiros em estudar os efeitos de substâncias genotóxicas padrão em microalgas, usando a espécie *Chlamydomonas reinhardtii*. Desde então, Sastre *et al.* (2001) estudaram os efeitos da luz ultravioleta em

Rhodomonas sp. Com *Euglena gracilis*, Watanabe & Suzuki (2002) testaram o efeito do cloreto de cádmio, Aoyama *et al.* (2003) testaram substâncias genotóxicas padrão, e Hayashi *et al.* (2004) testaram a capacidade de reparo destas células crescidas na luz e no escuro, após exposição à radiação ionizante. Ciniglia *et al.* (2005) estudaram o efeito do Triclosan (um desinfetante) em *Closterium ehrenbergii* e, mais recentemente, Desai *et al.* (2006) avaliaram os efeitos do cádmio sobre a diatomácea *Chaetoceros tenuissimus*. No Brasil, não foram encontrados trabalhos de ensaio cometa com algas. As algas planctônicas diferem fundamentalmente de uma célula animal devido ao seu metabolismo autotrófico, à presença de parede celular, ao tamanho da célula e ao conteúdo de DNA. Essas características complicam algumas etapas do procedimento do ensaio cometa, especialmente a lise celular e a avaliação das imagens de cometa (Erbes *et al.*, 1997), fazendo com que sejam necessários esforços para a adaptação da técnica do cometa em microalgas.

A região costeira do Estado de São Paulo vem sofrendo impactos de uma grande quantidade de poluentes, incluindo vários tipos de agentes genotóxicos. A ocorrência de poluentes químicos capazes de causar danos no DNA representa uma ameaça à saúde humana bem como à do ecossistema. Informações sobre quebras do DNA em microalgas podem resultar em poderosos biomarcadores que poderão ser utilizados na aqüicultura, em programas de manejo ambiental, bem como na elaboração de políticas de programas de saúde pública.

As substâncias carcinogênicas podem ser classificadas em classe I – causam câncer em humanos expostos; classe II – provavelmente causam câncer em humanos expostos, e classe III – possivelmente causam câncer em humanos expostos, sendo que há poucas evidências publicadas de atividade carcinogênica.

A 4-nitroquinolina N-óxido (4NQO) é considerada uma substância carcinogênica classe II, com dados experimentais que comprovam a sua característica carcinogênica, neoplastigênica e tumorigênica. Ela foi sintetizada pela primeira vez por Ochiai e colaboradores ao prepararem N-óxido de quinolina por meio de peróxido de hidrogênio e adicionando um nitro-radical (Nakahara *et al.*, 1957). Sua carcinogenicidade foi relatada pela primeira vez por Nakahara *et al.* (1957), e desde então os pesquisadores japoneses se dedicaram a estudar as propriedades biológicas e moleculares da 4NQO. A 4NQO é um pré-carcinogênico, ou seja, ela precisa ser metabolizada pela maquinaria celular para se ativar como um carcinogênico que é capaz de se ligar covalentemente ao DNA, particularmente à guanina e adenina (Bailleul *et al.*,

1989). A 4NQO é um dos poucos carcinogênicos químicos que possui processo metabólico bem caracterizado (Kiyohara *et al.*, 1991 *apud* Héron-Milhavet *et al.*, 2001). Existem dados que comprovam sua mutagenicidade em humanos feitos pelos testes de inibição de DNA, síntese não-programada de DNA e troca das cromátides irmãs (Lewis, 1991). Dentre os compostos genotóxicos, a 4NQO é considerada uma substância modelo pois já foi extensivamente estudada em ensaios de mutagenicidade em vírus (Endo *et al.*, 1961), bactérias (Okabayashi *et al.*, 1965, Birošová *et al.*, 2005), fungos (Nagai, 1969) e peixes (Diekmann *et al.*, 2004). A interação da 4NQO com o DNA foi provada em experimentos *in vitro* com DNA de bactérias (*Escherichia coli*), de protistas (*Euglena*) (Malkin & Zahalsky, 1966), e de timo de bezerro (Nagata *et al.*, 1966). Essa interação também já foi observada *in vivo* em ratos (Matsushima *et al.*, 1967). Além disso, do ponto de vista técnico, a 4NQO é um composto nitro-aromático que pode ser facilmente manipulado devido às suas propriedades físico-químicas como a lipofilia e volatilidade (Diekmann *et al.*, 2004), seu uso é recomendado como controle positivo em testes de mutação gênica em células de mamífero (*mouse lymphoma assay*) (Lima & Ribeiro, 2003) e pode ser usado como indutor de danos no DNA mimetizando a ação da luz UV (Hömmle *et al.*, 2000; Héron-Milhavet *et al.*, 2001). Em algas, Erbes *et al.* (1997) verificaram que a 4NQO é genotóxica para *Chlamydomonas reinhardtii*, e Harwood *et al.* (1989) verificaram que há interação entre a microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* e a 4NQO de forma a diminuir significativamente a mutagenicidade da 4NQO em solução (avaliado pelo SOS Chromotest, um ensaio bacteriano colorimétrico).

O benzo[a]pireno (BAP) é um HPA de alto peso molecular. Ele é um composto de 5 anéis de benzeno (Juhász & Naidu, 2000), e está presente nos produtos da combustão incompleta, como na fumaça do tabaco, em alimentos grelhados e em ambientes poluídos (Boysen & Hecht, 2003). O BAP foi classificado pela USEPA como um poluente prioritário: um composto selecionado com base na sua reconhecida ou provável propriedade carcinogênica, teratogênica ou de toxicidade aguda. Estudos em muitas espécies animais demonstraram a carcinogenicidade do BAP após administração por várias vias. Além disso, o BAP também se mostrou genotóxico em uma ampla gama de ensaios com células de mamíferos e bactérias, e assim, sua ocorrência no ambiente deve ser considerada (Juhász & Naidu, 2000). Assim como a 4NQO, o BAP é um pré-carcinogênico, ou seja, ele requer ativação metabólica a intermediários reativos para induzir efeitos tóxicos (Miller & Ramos, 2001). A habilidade para metabolizar HPAs é

descrita para vertebrados, fungos e bactérias. Para algas, há pouca informação disponível (Juhász & Naidu, 2000). As algas *Pseudokirchneriella subcapitata*, crescidas em condições fotoautotróficas, metabolizam BAP em cis-dihidrodióis, indicando que um sistema de enzima dioxigenase está envolvido de modo similar ao encontrado em procariotos heterotróficos (Cody *et al.*, 1984), diferentemente do sistema de enzima monoxigenase, encontrados em outros organismos eucarióticos como fungos (Warshawsky *et al.*, 1988 *apud* Juhász & Naidu, 2000). Este sistema também conjuga o BAP em ésteres de sulfato e conjugados de glicose e excreta esses produtos no meio (Warshawsky *et al.*, 1990). Acredita-se que a toxicidade do BAP se deva à formação de quinonas (Cody *et al.*, 1984), que podem ser tóxicas para as células por mecanismos que envolvem quebras de fitas de DNA, geração de radicais livres, interferência na respiração mitocondrial, entre outros (Smith, 1985 *apud* Warshawsky *et al.*, 1995). O efeito do BAP no crescimento de microalgas já foi descrito para a alga verde *Scenedesmus subspicatus* (Djomo *et al.*, 2004) e para a diatomácea *Thalassiosira pseudonana* (Bopp & Lettieri, 2007). Além disso, tanto microalgas (Gossiaux *et al.*, 1998; Okay *et al.*, 2000) quanto macroalgas (Kirso & Irha, 1998) têm a capacidade de bioconcentrar o BAP, de forma que o estudo dos efeitos desta substância torna-se extremamente relevante.

Este estudo fez parte do projeto “Diferenças interespecíficas nos danos do DNA e formação de micronúcleos causados por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em organismos costeiros”, coordenado pelo Prof. Dr. Phan Van Ngan, financiado pelo CNPq (processo no. 471084/2004-2).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O trabalho teve como objetivo estudar a aplicabilidade do uso de microalgas encontradas em águas brasileiras na avaliação de danos no DNA causados pela exposição a substâncias genotóxicas.

2.2. Objetivos específicos

- Procurar uma espécie de microalga adequada para o ensaio cometa, dentro das microalgas coletadas em águas brasileiras e mantidas no Banco de Microorganismos Marinhos do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, utilizando como critério principal a facilidade de lise celular.
- Estabelecimento de condições experimentais ótimas para o ensaio cometa desta microalga.
- Avaliar danos no DNA causados pela exposição desta microalga à substância genotóxica modelo 4-nitroquinolina N-óxido.
- Aplicar os métodos desenvolvidos para estudar danos no DNA causados pela exposição desta microalga a benzo[a]pireno, um hidrocarboneto policíclico aromático genotóxico comumente encontrado em águas contaminadas com produtos de petróleo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Organismos utilizados e condições de cultivo

Foram utilizados organismos marinhos fitoplanctônicos da espécie *Dunaliella tertiolecta* Butcher 1959 (cepa CF1 do Laboratório de Microorganismos Marinhos do Instituto Oceanográfico da USP, isolada de Ubatuba/SP) (fig. 1). Microalgas deste gênero são tradicionalmente classificados como pertencentes à família Polyblepharidaceae, ordem Volvocales; porém, alguns autores sugeriram que este gênero pertencesse à nova família Dunaliellaceae, ordem Dunaliellales (Borowitzka & Borowitzka, 1988). São algas verdes, da classe Chlorophyceae, divisão Chlorophyta. Trata-se de uma espécie unicelular biflagelada de ampla distribuição no mundo inteiro. Células do gênero *Dunaliella* não possuem parede celular e a célula é envolta somente por uma fina membrana plasmática elástica, sendo por isso chamadas de células *naked*. Esta membrana, porém, possui características especiais, como a ainda não bem compreendida baixa permeabilidade ao glicerol (Brown *et al.*, 1982 *apud* Oren, 2005). Elas possuem também um tipo de envelope celular semelhante a um glicocálix, possível de ser observado especialmente em células em fase estacionária. Ela tem dois flagelos de mesmo tamanho e um único cloroplasto, e no caso de espécies marinhas como *D. tertiolecta*, o cloroplasto possui um pirenóide central (Borowitzka & Borowitzka, 1988). Elas se reproduzem por divisão longitudinal da célula móvel ou por fusão de duas células móveis para formar um zigoto (Oren, 2005). Algumas espécies de *Dunaliella* podem também desenvolver estágios palmelóides vegetativos consistindo de células redondas não-móveis (Oren, 2005). Os pesquisadores têm se interessado no estudo de algas do gênero *Dunaliella* também devido ao seu potencial para ser usado como suplemento alimentar para humanos (Mokady *et al.*, 1989).

As algas foram cultivadas em meio de cultura Guillard “f/2”, a 20°C, ciclo de claro/escuro de 12h/12h, assim como são tradicionalmente mantidas no Laboratório de Microorganismos Marinhos do IOUSP. As cepas foram mantidas no interior de uma sala com refrigeração termostatizada, sobre bancadas com iluminação proveniente de lâmpadas fluorescentes posicionadas em sua parte inferior e também no interior de uma incubadora termostatizada com iluminação proveniente de lâmpadas fluorescentes posicionadas na porta (fig. 2).

Toda a vidraria utilizada para o cultivo foi usada exclusivamente para este fim, não sendo usada com materiais químicos diversos. O protocolo detalhado do preparo de todos os reagentes encontra-se descrito no item 10 - Anexo 3 – Preparo de Soluções.

3.1.1. Meio de Cultura

O meio Guillard “f/2” consiste basicamente de água do mar enriquecida de nitrato de sódio (NaNO_3), fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4), meta silicato de sódio (Na_2SiO_3), metais traço (cobre, zinco, cobalto, manganês, molibdato, ferro) e vitaminas (tiamina, biotina, vitamina B_{12}). A água do mar utilizada para preparação do meio de cultura foi coletada em Ubatuba, município do litoral Norte do Estado de São Paulo. A salinidade dos meios de cultura de *D. tertiolecta* foi mantida a 32, adicionando-se água destilada autoclavada no volume adequado. A salinidade foi medida com auxílio de um refratômetro.

3.1.2. Luminosidade

Na sala termostatzada, a iluminação dos frascos foi provida por lâmpadas OSRAM luz do dia, de 40 W de potência. Cada bancada de cultivo possui 6 lâmpadas em sua parte inferior.

Na incubadora, a iluminação dos frascos foi provida por 2 lâmpadas PHILLIPS luz do dia, de 40 W de potência, posicionadas longitudinalmente em sua porta.

A radiação luminosa das condições de cultivo foi medida com um *quantameter*, que fornece leituras em $\text{quanta.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Um temporizador automático controlou o regime de luz de 12 h luz/ 12h escuro, sendo as luzes acesas às 8 h e apagadas às 20 h.

3.1.3. Culturas

As culturas estáticas de *D. tertiolecta* foram feitas em balões de capacidade para 1 L, com 400 mL de meio de cultura e tampões de algodão envoltos em gaze. Com este volume não é necessária aeração com ar comprimido, já que as trocas gasosas através do tampão são suficientes para o crescimento da cultura (Sipaúba-Tavares & Rocha, 2003).

Para inoculação das algas nos balões de cultivo contendo meio Guillard “f/2” previamente preparado, foi feita inicialmente a contagem das células do inóculo, retirado da cultura estoque. Com base na densidade das células do inóculo (n° de

células/ mL), o volume (V_1) a ser adicionado em cada balão foi determinado utilizando a seguinte fórmula:

$$V_1 = (C_2 \cdot V_2) / C_1$$

onde:

V_1 é o volume de inóculo a ser adicionado (em mL)

V_2 é o volume do meio de cultura (em mL)

C_1 é a densidade de células do inóculo (em nº de células/ mL)

C_2 é a densidade de células desejadas no meio de cultura (em nº de células/ mL)

Adicionou-se o inóculo ao balão de forma que a densidade inicial das células fosse de 10.000 células/ mL. Esta densidade inicial de células é recomendada na maioria dos testes padronizados de inibição de crescimento algal (Moreno-Garrido *et al.*, 2000).

A densidade de células foi determinada utilizando-se câmaras de contagem tipo hemacitômetro (Câmara de Neubauer, de 0,1 mm de profundidade; e Câmara Fuchs-Rosenthal, de 0,2 mm de profundidade), segundo método descrito por Guillard (1973) e Smayda *et al.* (1978).

As câmaras e as lamínulas foram previamente lavadas com Extran® neutro 2% e água destilada. Para secar, elas foram enxaguadas com acetona 100% e o excesso de acetona era absorvido com uma gaze. Entre as amostras, as câmaras foram enxaguadas com água destilada e em seguida com acetona, e então foram secas com uma gaze. As amostras foram homogeneizadas por inversão, e as câmaras foram preenchidas com o auxílio de uma micropipeta. Enquanto a contagem era feita em uma das câmaras, as outras permaneciam dentro de placas de petri com algodão umedecido, para que a evaporação não influenciasse na distribuição das células dentro da câmara. Foram feitas 2 contagens de cada amostra. As amostras menos densas eram contadas na câmara de maior volume (Fuchs-Rosenthal) e as mais densas eram contadas na câmara de menor volume (Neubauer).

O cálculo da densidade na Câmara Fuchs-Rosenthal foi feito obedecendo-se a fórmula:

$$d = Q \times 10^4 / 2a$$

onde “d” é a densidade (em células/ mL), “Q” é a contagem total de células e “a” é o número de áreas percorridas durante a contagem (sendo cada área de 1 mm²).

O cálculo da densidade na Câmara de Neubauer foi feito obedecendo-se a fórmula:

$$d = Q \times 10^4 / a$$

onde “d” é a densidade (em células/ mL), “Q” é a contagem total de células e “a” é o número de áreas percorridas durante a contagem (sendo cada área de 1 mm²).

O número de áreas a serem percorridas variou de acordo com a densidade das amostras, sendo que em amostras menos densas foram percorridas mais áreas de contagem, enquanto que em amostras mais densas, menos áreas. As células em divisão (contendo o dobro do protoplasma, porém, unidas por uma única membrana) foram contabilizadas como somente 1 célula.

O meio de cultura recém-inoculado foi mantido a 20°C com ciclo claro/escuro de 12h/12h tanto na sala de cultura quanto na incubadora. A escolha da incubadora como local de crescimento das algas foi devido a um problema técnico apresentado pela sala termostatizada durante os experimentos. Desta forma, os primeiros experimentos com *D. tertiolecta* (exposição a 4NQO – experimento 1) foram feitos com células cultivadas na sala termostatizada, enquanto que os demais (exposição a 4NQO – experimento 2 e exposição ao BAP) foram feitos com células cultivadas na incubadora.

3.2. Reagentes

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. A 4NQO (CAS : 56-57-5, pureza 99%); o BAP (CAS: 50-32-8, pureza 96%), a agarose NMP e a agarose LMP foram obtidos da Sigma-Aldrich do Brasil. O DMSO (pureza $\geq 99,9\%$) e o H₂O₂ 30% foram obtidos da Merck S. A.

3.3. Exposição à 4NQO

3.3.1. Experimento 1

Tubos de centrifuga com tampa foram preenchidos com 9,95 mL de meios de cultura contendo células de *D. tertiolecta* (fase exponencial, cultivadas na sala termostatizada). Foram adicionados 50 µL de 4NQO diluídas em DMSO (dimetil-sulfóxido) 30% aquoso (concentração final no tubo: 0,15%) aos tubos de forma a obter as concentrações de 0; 0,25 µM; 0,5 µM e 1 µM de 4NQO, além de um controle com DMSO. A exposição das células (em fase exponencial, cultivadas na sala termostatizada) foi feita por 1 h no escuro. Os tubos foram colocados em um banho termostatizado adaptado para que a temperatura do experimento se mantivesse a 20°C

durante todo o período. Após a exposição, os tubos foram retirados do banho e centrifugados a 1.400 g por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensionado em 500 µL de meio Guillard “f/2”. As suspensões foram analisadas quanto à sua viabilidade (descrição no item 3.5) e foram usadas para o ensaio cometa (descrição no item 3.6). O experimento foi feito em duplicata (denominados I e II).

As lâminas foram coradas com duas maneiras distintas para comparação das duas técnicas. Primeiramente, as lâminas foram coradas com Brometo de Etídio (BrEt), um corante fluorescente, frequentemente utilizado nos protocolos de ensaio cometa. A sua fluorescência é temporária, sendo necessário que a análise no microscópio de epifluorescência seja feita logo após coloração. Após a análise com BrEt, as mesmas lâminas foram coradas pelo método da prata, sendo esta uma coloração permanente, possível de ser observada em microscópio de luz (descrição detalhada da coloração nos itens 3.6.4 e 3.6.5).

3.3.2. Experimento 2

Células em fase exponencial cultivadas na incubadora foram expostas a concentrações menores que as utilizadas no experimento 1 (item 3.3.1), sendo elas: 0, 4, 20 e 100 nM de 4NQO por 1, 2 e 4 h, incluindo um controle com o solvente, DMSO. Os experimentos foram feitos em duplicata, com células cultivadas em meios de cultura e momentos distintos. Após a exposição, os tubos foram centrifugados a 3.000 g por 15 min. e os sobrenadantes foram descartados. O precipitado foi ressuspensionado em 500 µL de Guillard “f/2”, formando-se assim a suspensão celular. Essas suspensões foram analisadas quanto à sua viabilidade (descrição no item 3.5) e foram utilizadas para o ensaio cometa (descrição no item 3.6). O experimento foi feito em duplicata (denominados I e II).

3.4. Exposição ao BAP

Células de *D. tertiolecta* em fase exponencial cultivadas na incubadora foram expostas a 0; 0,4; 2 e 10 µM de BAP por 1, 2 e 4 h, incluindo um controle com o solvente, DMSO. Tais concentrações foram escolhidas com base na literatura. Após a exposição, os tubos foram centrifugados a 3.000 g por 15 min. e os sobrenadantes foram descartados. O precipitado foi ressuspensionado em 500 µL de Guillard “f/2”, formando-se

assim a suspensão celular. Essas suspensões foram analisadas quanto à sua viabilidade (descrição no item 3.5) e foram utilizadas para o ensaio cometa (descrição no item 3.6).

3.5. Viabilidade

Ao conduzir estudos com o ensaio cometa *in vitro*, deve-se ter o cuidado para evitar condições que levem a resultados positivos de danos no DNA que não refletem a genotoxicidade, mas sim danos associados à citotoxicidade (Tice *et al.*, 2000). Anderson e colaboradores (1998) sugerem que a concentração máxima da substância teste produza viabilidade > 75% para evitar falsos positivos gerados pela citotoxicidade (uma discussão mais aprofundada em relação às células apoptóticas e necróticas encontra-se no item 5.2.1. da discussão).

A capacidade de natação foi utilizada como critério de viabilidade das células. As suspensões preparadas após exposição a 4NQO e BAP foram observadas em câmaras de contagem tipo Neubauer e/ou Fuchs- Rosenthal e o número de células imóveis foi contado, obtendo-se a densidade de células imóveis (células/ mL). Após esta contagem, as amostras foram fixadas em lugol, e então o número total de células foi contado, obtendo-se a densidade total de células (a metodologia de contagem e o cálculo da densidade de células está descrita no item 3.1.3).

O cálculo da densidade de células móveis foi feito obedecendo-se a fórmula:

$$d_{\text{móveis}} = d_{\text{total}} - d_{\text{imóveis}}$$

onde:

$d_{\text{móveis}}$ é a densidade de células móveis após tratamento

d_{total} é a densidade total de células após tratamento

$d_{\text{imóveis}}$ é a densidade de células imóveis após tratamento

O cálculo da frequência de células móveis em porcentagem ($FR_{\text{móveis}}$ - %) após o tratamento foi feito seguindo-se a fórmula:

$$FR_{\text{móveis}} (\%) = d_{\text{móveis}} \times 100 / d_{\text{total}}$$

3.6. Ensaio cometa

O procedimento do Ensaio foi adaptado do protocolo descrito por Singh *et al.* (1988) e Erbes *et al.* (1997). O termo “cometa” será usado no texto para designar o padrão de migração de DNA de células individuais produzidas por este ensaio.

3.6.1. Preparação da lâmina

Lâminas de microscopia com uma extremidade fosca foram lavadas com detergente Extran® neutro 2% e álcool. A limpeza da lâmina é extremamente importante para a aderência do gel de agarose que será colocado na etapa descrita a seguir. As lâminas foram revestidas com uma 1ª. camada de agarose de ponto de fusão normal (*normal melting point* - NMP) a 1,5% em água destilada, a 60°C. A agarose foi dissolvida por fervura e colocada em banho-maria até atingir a temperatura desejada. Ela foi espalhada sobre a lâmina com auxílio de uma lamínula para obtenção de esfregaço (aproximadamente 0,2 mL agarose NMP / lâmina, sendo que o excesso escorre para fora da lâmina), e em seguida as lâminas foram deixadas de um dia para o outro em uma superfície plana, à temperatura ambiente, para secar. Esta etapa assegura que uma 2ª. camada de agarose contendo a suspensão de células fique devidamente aderida à lâmina, sem riscos de descolamento e perda de material.

As lâminas com 1ª. camada de agarose NMP foram marcadas a lápis na extremidade fosca. Foram misturados 10 µL de suspensão celular a 110 µL de agarose LMP 0,8% em solução salina de Kenny, a 37 °C. Foram pipetados 110 µL da mistura agarose LMP + suspensão sobre as lâminas pré-revestidas com agarose NMP e uma lamínula de 24 x 60 mm previamente limpa foi colocada sobre a mistura. As lâminas ficaram sobre uma placa de vidro posicionada sobre gelo picado por 15 min. para que a agarose gelatinizasse, e após este período a lamínula foi retirada. Para cada suspensão foram preparadas duas lâminas.

3.6.2. Lise, relaxamento e eletroforese

A lise foi feita com Solução de Lise Alcalina Iônica (SLAI: 0,1% DSS, 300 mM NaOH, 30 mM Na₂EDTA, pH>13) recém-preparada durante 15 min. e à temperatura ambiente. Usualmente no ensaio cometa, a lise é feita em condições refrigeradas, mas devido ao curto tempo necessário para este tipo de lise (não representando, portanto, perigo de descolamento da agarose da lâmina), e devido à

dificuldade de dissolução do DSS em baixas temperaturas, optou-se por fazer a lise à temperatura ambiente.

Após a lise, as lâminas foram colocadas na cuba de eletroforese em posição aleatória contendo solução de eletroforese gelada (300 mM NaOH, 1 mM Na₂EDTA, pH>13) por 15 min. Esta etapa consiste no relaxamento. Quanto maior o tempo de exposição a esta solução alcalina, maior o grau de relaxamento e a expressão de sítios álcali-lábeis de DNA. Geralmente o tempo de exposição fica entre 10-60 min. (Gontijo & Tice, 2003). Em microalgas este tempo varia de 5-30 min.

A corrida foi conduzida a 0,70 V/cm, 300 mA. O volume de solução de eletroforese no interior da cuba foi alterado para se obter a corrente desejada de 300 mA. A cuba foi mantida sobre gelo picado durante todo o período de relaxamento e corrida de eletroforese, para evitar aquecimento e conseqüente descolamento da agarose ou aumento nos danos de DNA causados pela temperatura da corrida (Speit *et al.*, 1999).

Todas essas etapas foram feitas sob luz fraca indireta para evitar possíveis danos causados pela luz.

3.6.3. Neutralização e Fixação

Após eletroforese, para que a coloração seja feita com sucesso, é necessário que as lâminas tenham um pH adequado. Para tanto, faz-se necessário a etapa de neutralização. As lâminas foram cobertas com a solução de neutralização (0,4 M Tris pH 7,5) à temperatura ambiente, por 3 vezes de 5 min. cada. As lâminas foram então deixadas em posição inclinada por 15 min. para que o excesso de solução de neutralização escorresse. Elas então foram fixadas com etanol gelado por 5 min., e deixadas à temperatura ambiente para secar.

Após desidratação, as lâminas podem ser armazenadas para serem coradas em um momento conveniente. A desidratação é importante para que seja evitada uma difusão excessiva do DNA no gel.

A partir desta etapa, os procedimentos podem ser feitos com iluminação normal, uma vez que após a eletroforese, o aumento de danos no DNA não resultará em aumento de migração. As exceções nas condições de iluminação são relatadas.

3.6.4. Coloração com BrEt

Todas as lâminas da exposição ao 4NQO e ao BAP foram coradas com BrEt. Elas foram coradas logo antes da análise pipetando-se 60 µL de BrEt (5 µL/mL) e colocando-se uma laminula no topo.

3.6.5. Coloração com prata

A coloração com prata (referente ao experimento 1 de exposição a 4NQO) foi feita segundo protocolo adaptado de Cerda *et al.* (1997).

As lâminas foram cobertas por solução de fixação A (15% ácido tricloroacético, 5% sulfato de zinco heptahidratado, 5% glicerol) durante 10 min., lavadas por 2 vezes com água destilada e colocadas para secar em temperatura ambiente até o dia seguinte.

Preparou-se a solução de coloração final (D) imediatamente antes do uso. A solução D é composta da mistura de 32 mL de solução B (5% carbonato de sódio) com 68 mL de solução C (0,02% nitrato de amônia, 0,02% nitrato de prata, 0,1% ácido tungstosilícico, 0,05% formaldeído). As lâminas foram cobertas por essa solução e mantidas em banho-maria a 34°C ao abrigo da luz por cerca de 5 min., agitando periodicamente. Foi feita troca por solução D nova até as lâminas atingirem coloração cinzenta ou amarronzada. O ponto ótimo de coloração foi confirmado com rápida observação em microscópio ótico comum. Nos experimentos deste trabalho foi necessária somente uma troca de solução D por conjunto de lâminas. Ao término, lavaram-se as lâminas por 2 vezes com água destilada.

As lâminas foram então imersas em solução de interrupção E (1% ácido acético) por 5 min., e lavadas 2 vezes com água destilada. Após secar em temperatura ambiente, as lâminas apresentam-se prontas para serem conservadas por período prolongado e analisadas em momento conveniente.

Neste processo de coloração, quando o gel é imerso em uma solução contendo complexos de prata-amina ligados ao ácido tungstosilícico coloidal, os íons de prata são transferidos do ácido tungstosilícico para as proteínas / DNA no gel por meio de troca de íons. O formaldeído reduz os íons de prata em prata metálica para produzir as imagens. O ácido tungstosilícico evita que os íons de prata sejam imediatamente reduzidos pelo formaldeído, precipitando e depositando no gel de agarose antes que a prata core preferencialmente a proteína/ DNA (Willoughby & Lambert, 1983 *apud* Yokomizo *et al.*, 2006). A reação é interrompida quando a intensidade desejada é alcançada.

3.6.6. Análise

As lâminas coradas com BrEt foram observadas no aumento de 400X, sob microscópio de epifluorescência Axioskop 40 ZEISS com lâmpada UV de mercúrio 50 W e conjunto de filtros no. 14, sendo excitação de 510-560 nm, emissão de 590 nm, e *beam splitter* FT 580. Foram capturadas imagens de 50 células por lâmina de forma aleatória (excluindo-se as beiradas e áreas em torno de bolhas de ar), totalizando 100 cometas para cada condição. Após a captura da imagem, a lamínula foi descartada e a lâmina foi mantida em etanol 100% por 5 min. para retirada do excesso de corante e desidratação da lâmina.

Após captura das imagens das lâminas coradas com BrEt do experimento 1 de exposição a 4NQO, estas mesmas lâminas foram também coradas pelo método da prata segundo descrição do item 3.6.5. Estas lâminas foram analisadas sob microscópio de luz NIKON. Da mesma forma que na coloração com BrEt, foram capturadas imagens de 50 células por lâmina de forma aleatória.

Todas as imagens capturadas (coradas com BrEt ou prata) foram convertidas para 8-bits, tamanho de 520 x 390 pixels e extensão bitmap pelo *software* ImageConverter Comet, criado especificamente para a finalidade de ajustar o formato do arquivo para o *software* de análise de cometas. As imagens dos cometas corados com prata, além de serem convertidas no padrão descrito, receberam também tratamento de inversão de cor, ou seja, o pixel preto torna-se branco, o branco torna-se preto e os tons de cinza invertem-se com os respectivos tons de cinza.

Os cometas foram analisados no *software* de análise de imagem Tritex CometScore, calibrado com um régua micrométrica WILD de 2 mm dividida em 200 partes. O programa gera um total de 17 parâmetros dos quais somente o momento de cauda, o comprimento de cauda e a porcentagem de DNA na cauda foram usados para este trabalho. Os cometas foram analisados principalmente segundo o parâmetro momento da cauda, exceto os cometas das lâminas do experimento 1 de exposição a 4NQO, que foram também analisados segundo o parâmetro comprimento da cauda, para fins de comparação entre as diferentes colorações. O momento de cauda foi escolhido por ser considerado um parâmetro comumente usado no ensaio cometa (Mitchelmore & Chipman, 1998). Porém, o seu cálculo no cometa depende da porcentagem de DNA na cauda, que por sua vez depende da intensidade de fluorescência da cauda (segundo manual do Tritex CometScore). Desta forma, o seu uso fica restrito à análise de cometas corados por corantes fluorescentes. O parâmetro comprimento de cauda, por sua vez,

independe de fluorescência e também é comumente utilizado (Rojas *et al.* 1999). Assim, este foi o parâmetro escolhido para a comparação entre as colorações de BrEt e prata.

Além disso, os cometas também foram analisados pelo método de índice de danos, conforme descrito por Collins *et al.* (1995).

Para calcular o índice de danos (ID), 100 células de cada condição (50 de cada lâmina) foram visualmente classificadas em 5 classes, de 0 a 4. A classe 0 corresponde aos cometas considerados intactos, sem danos causados pela exposição; a classe 1 a cometas com danos mínimos; a classe 2 a cometas com danos médios; a classe 3 a cometas com danos intensos; e a classe 4 corresponde aos cometas com danos máximos.

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

$$ID\ total = 0.(n\ classe\ 0) + 1.(n\ classe\ 1) + 2.(n\ classe\ 2) + 3.(n\ classe\ 3) + 4.(n\ classe\ 4)$$

Assim, o ID do grupo poderia variar de 0 (completamente sem danos = 0 x 100 células classe 0) a 400 (máximo de danos = 4 x 100 células classe 4).

Os dados de ID foram correlacionados com os dados de momento de cauda, comprimento de cauda e porcentagem de DNA na cauda, pois tanto o ID quanto os parâmetros gerados pelo *software* de análise de imagens são comumente usados no ensaio cometa para quantificação de danos no DNA.

3.7. Análise estatística e apresentação dos resultados

Para comparações de comprimento da cauda e momento da cauda dos experimentos 1 e 2, os dados foram analisados usando o teste não paramétrico Kruskal-Wallis. Quando necessário, utilizou-se o teste *a posteriori* de Dunn para comparações entre tratamentos. Todos os testes estatísticos deste trabalho foram feitos utilizando-se o pacote estatístico do *software* BioEstat® 4.0. Os dados estão representados por gráficos de *box-plot* de mediana e quartis, gerados pelo *software* SigmaPlot® 10.0. A caixa (*box*) inclui 50% dos dados. O limite superior e o inferior da caixa marcam o 25º percentil e o 75º percentil respectivamente, a linha interna marca a mediana, e as suíças (*whiskers*) marcam o 10º e o 90º percentis.

Para comparações de número de células em cada classe de dano, os dados foram organizados em histogramas e para comparações entre o ID de cada condição, os dados foram organizados em tabelas. A relação dos dados de ID com as médias de momento da cauda, comprimento da cauda e porcentagem de DNA na cauda para cada

condição de exposição a 4NQO foi analisada em gráficos de dispersão, com adição de linha de tendência e R^2 , usando o *software* Microsoft Office Excel 2003®.

3.8. Estabelecimento de condições experimentais

Os experimentos descritos neste item foram realizados antes dos experimentos descritos até o momento e serviram como base para a determinação das condições ideais para a execução do ensaio cometa com microalgas. Se não especificado, os experimentos foram feitos segundo metodologia descrita nos itens anteriores.

3.8.1. Escolha da espécie e Teste de Lise

No ensaio cometa, a lise celular representa uma etapa importante por ter a finalidade de mover as membranas da célula e do núcleo para expor o DNA aos tratamentos subsequentes. É uma etapa de alta dificuldade, principalmente quando se tratam de células vegetais que, além de sua membrana plasmática, apresentam parede celular. No caso de microalgas, a lise pode ser dificultada também pela presença de sílica (como no caso de diatomáceas), carbonato de cálcio (como no caso de cocolioforídeos), ou outros materiais duros.

Assim com a cepa CF1 de *D. tertiolecta* escolhida para este trabalho, as outras cepas também foram provenientes de clones coletados e mantidos pelo Laboratório de Microorganismos Marinhos do Instituto Oceanográfico da USP.

Foram utilizadas culturas das algas *Dunaliella tertiolecta* cepa CF1, *Tetraselmis gracilis* cepa C1, *Tetraselmis alacris* cepa C1, *Tetraselmis* sp. cepa C2, *Chlorella minutissima* cepa C1, Cryptophyceae cepa C2 (gênero e espécie não identificados), *Hillea* sp. cepa PB1, *Ochromonas* sp. cepa Ub1, todas cultivadas na sala termostaticada. Foram confeccionadas lâminas contendo suspensões destas microalgas em agarose. Testaram-se duas soluções de lise e diferentes períodos de exposição. Foram elas: solução de lise alcalina iônica por 5 min., 15 min., 30 min., 1 h e 2 h e solução de lise salina aniônica por 1 h, 2 h e 4 h, além do controle.

3.8.1.1. Preparação da lâmina

Os meios de cultura contendo microalgas (2 mL) foram centrifugados a 1.100 g por 15 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensionado em 200 μ L

de tampão fosfato salino (PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8mM KH₂PO₄, pH 7,4), obtendo-se assim a suspensão.

A 2^a. camada de agarose contendo a mistura agarose LMP + suspensão foi feita misturando-se 10 µL de suspensão a 110 µL de agarose de LMP a 0,8% em PBS, a 37°C. A gelificação foi feita na geladeira por 20 min. Foram preparadas 18 lâminas de cada espécie de alga, duas para cada condição.

3.8.1.2. Teste de Lise – Solução e Tempo

As lâminas preparadas ficaram imersas em uma solução de lise alcalina iônica (SLAI: 0,01% DSS, 300 mM NaOH, 30 mM Na₂EDTA, pH>13) por 5 min., 15 min., 30 min., 1 h e 2 h, e em uma solução de lise salina aniônica (SLSA: 2,5 M NaCl, 10 mM Tris, 0,1 M Na₂EDTA, 1% n-lauroil-sarcosinato, 1% Triton X-100, pH 10) por 1 h, 2 h e 4 h. As soluções usadas eram recém preparadas e geladas (0 a 4°C), e a lise foi feita em geladeira.

Após a lise, as lâminas foram enxaguadas com água destilada. As lâminas tratadas com SLSA passaram pelo processo de relaxamento por 20 min. Após este período, as lâminas foram enxaguadas com água destilada. As lâminas tratadas com SLAI não passaram por esta etapa de relaxamento, uma vez que a solução de lise já é alcalina (pH > 13) e o processo de relaxamento ocorre juntamente com a lise.

As lâminas foram neutralizadas por 3 x 5 min. com solução de neutralização (0,4 M Tris, pH 7,5) e desidratadas com etanol gelado por 5 min.

3.8.1.3. Coloração

Uma lâmina de cada condição foi corada com Giemsa filtrado diluído 10X em água destilada por 45 min., enxaguado com água de torneira, e deixado à temperatura ambiente para secar. A lâmina restante foi corada com prata, segundo método descrito no item 3.6.5.

3.8.2. Fase Exponencial de Crescimento

Foram feitas quatro curvas de crescimento de *Dunaliella tertiolecta* cepa CF1 para determinar o período em que a cultura se encontra na fase exponencial de crescimento. Um dos meios foi mantido na sala de cultura (meio A) e o restante dos meios foram mantidos na incubadora (meios B-1, B-2 e B-3).

No cultivo, o termo crescimento refere-se às mudanças pelas quais a cultura passa, e é composto pela fase de indução ou *lag*, fase exponencial ou *log*, fase estacionária e fase senescente ou de declínio. Na fase exponencial as células começam a dividir-se regularmente a uma taxa constante. A taxa de crescimento é máxima nessa fase (Sipaúba-Tavares & Rocha, 2003). A população é mais uniforme em termos de composição química, atividade metabólica e outras características fisiológicas (Pelczar *et al.*, 1980).

Foram retiradas amostras do meio de cultura logo após ter sido colocado o inóculo no mesmo (t_0) e a cada 24 h. As coletas se mantiveram pelo período mínimo de 15 dias. Antes de cada coleta, o frasco foi agitado em sentido horário e anti-horário para homogeneização. As amostras (cerca de 5 mL) foram fixadas com 1 gota de lugol acético e armazenadas no escuro para posterior contagem.

A densidade de células em cada instante foi calculada segundo metodologia descrita no item 3.1.3. Os dados obtidos foram organizados em uma planilha e foram feitos gráficos semi-log da curvas de crescimento.

3.8.3. Citotoxicidade do peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

Para se avaliar a citotoxicidade das concentrações de H_2O_2 a serem utilizadas nos testes para determinação das condições de eletroforese, foi realizado um experimento de exposição a concentrações crescentes de H_2O_2 (0; 0,25; 0,5 e 1mM) no escuro a 20°C, pelo período de 1, 2 e 4 horas. Tubos de centrífuga com tampa foram preenchidos com 9,95 mL de meios de cultura contendo células de *D. tertiolecta* (fase exponencial, cultivadas na sala termostatzada). Foram adicionados 50 μ L de soluções estoque de H_2O_2 diluídas em meio Guillard “f/2” aos tubos de forma a obter as concentrações de 0; 0,25; 0,5 e 1 mM de H_2O_2 . Para cada período de exposição, foram feitos 3 experimentos com meios de cultura cultivados e expostos independentemente. Os tubos foram colocados em uma incubadora com temperatura controlada a 20 °C, no escuro. Após a exposição, os tubos foram retirados e centrifugados a 1.400 g por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspendido em 500 μ L de meio de cultura.

A $FR_{m\acute{o}veis}$ foi calculada segundo metodologia descrita no item 3.5.

Para comparações da $FR_{m\acute{o}veis}$ expostas ou não a H_2O_2 , os dados foram analisados usando o teste de ANOVA. Quando necessário, utilizou-se o teste *a*

posteriori de Dunnet para comparações entre tratamentos. Os dados estão representados por gráficos de barra com as médias. As suíças representam os desvios padrão.

3.8.4. Determinação das condições de eletroforese

Considera-se necessário ajustar as condições do ensaio cometa para cada tipo celular e tratamento realizado, a fim de obter a melhor sensibilidade e especificidade para o teste. O ajuste é necessário porque não existem células sem danos no DNA, uma vez que o próprio metabolismo celular pode gerar em torno de 1.000 lesões diárias do DNA/ célula (Gontijo & Tice, 2003). O que se faz rotineiramente é modular as condições técnicas (tempo de relaxamento e eletroforese) para que um mínimo de DNA migre da cabeça para a cauda do cometa nos controles negativos.

Suspensões de *D. tertiolecta* (fase exponencial, cultivada na sala termostatzada) foram expostas a H₂O₂ (0,5 mM) diluídas em meio de cultura Guillard “f/2” pelo período de 1 hora a 20°C no escuro, juntamente com um controle. As microalgas foram recolhidas por centrifugação, e então foram submetidas à lise (15 min.), relaxamento (15 min.) e eletroforese em diferentes voltagens (0,88; 0,77 e 0,70 V/cm; todos a 300 mA, por 20 min.). Cada eletroforese foi feita em duplicata, com células cultivadas e expostas à H₂O₂ em momentos distintos. Foram preparadas 2 lâminas para cada condição. Uma descrição mais detalhada do protocolo do ensaio cometa encontra-se no item 3.6.

Uma amostra de cada suspensão foi analisada sob microscópio para se avaliar a mobilidade das células de *D. tertiolecta* expostas a H₂O₂, certificando-se assim da ausência de efeito citotóxico apresentado pela concentração de H₂O₂ testada.

As lâminas foram coradas com nitrato de prata, conforme metodologia descrita no item 3.6.5, e analisadas através do índice de danos, conforme descrição no item 3.6.6.

3.8.5. Citotoxicidade da 4NQO

Como já apresentado anteriormente, no ensaio cometa a concentração da substância genotóxica em estudo não deve induzir morte celular. Desta forma, para auxiliar na escolha das concentrações a serem usadas nos experimentos de ensaio cometa com exposição a 4NQO, foram feitos experimentos para avaliar a citotoxicidade da 4NQO em *D. tertiolecta* (fase exponencial, cultivadas na sala termostatzada)

expostas a concentrações crescentes (0; 1; 2,5; 5; 7,5 e 10 μM) por 1, 2 e 4 horas a 20°C no escuro. Também foram feitas exposições ao DMSO (solvente). Para cada período de exposição, foram feitos 3 experimentos com meios de cultura cultivados na sala termostaticada e expostos independentemente. Após a exposição, os tubos foram retirados e centrifugados a 1.400 g por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensionado em 500 μL de meio de cultura.

A $\text{FR}_{\text{móveis}}$ foi calculada segundo metodologia descrita no item 3.5.

Para comparações da $\text{FR}_{\text{móveis}}$ expostas ou não a 4NQO, os dados foram analisados usando o teste de ANOVA. Quando necessário, utilizou-se o teste *a posteriori* de Dunnett para comparações entre tratamentos. Os dados estão representados por gráficos de barra com as médias. As suíças representam os desvios padrão.

4. RESULTADOS

4.1. Estabelecimento de condições experimentais

4.1.1. Escolha da espécie e teste de lise

A tabela I mostra quais as algas que lisaram após exposição à SLAI ou à SLSA. As figuras 3 a 12 mostram imagens das células das diferentes algas, lisadas e não lisadas, coradas com Giemsa e com nitrato de prata. As duas colorações foram usadas devido à facilidade de observar a lise usando um ou outro corante, dependendo da espécie. Observa-se que as algas da espécie *Chlorella minutíssima* (fig. 3), além de ter um tamanho que dificulta a análise, não apresentou lise celular em nenhuma das condições testadas. Cryptophyceae (fig. 4) e *Dunaliella tertiolecta* (fig. 5) e foram as mais facilmente lisadas, sendo necessário apenas 5 min. de imersão na SLAI, ou 1 h na SLSA. *Hillea* sp. (fig. 6), *Ochromonas* sp. (fig. 7), e *Tetraselmis alacris* (fig. 8) não apresentaram lise celular em nenhuma das condições testadas. *Tetraselmis* sp. (figs. 9 e 10) e *Tetraselmis gracilis* (figs. 11 e 12) não são lisadas pela SLSA mesmo após 4 h. Em 5 min. de imersão na SLAI, os dois grupos apresentavam lise celular de parte de suas células, porém, mesmo com 2 h de imersão nesta mesma solução de lise, nenhum dos dois grupos apresentou lise celular em 100% de suas células (figs. 10 e 12). Combinando os dados de lise com a quantidade de informação disponível na literatura destas algas, optou-se por utilizar as algas da espécie *Dunaliella tertiolecta* nos experimentos deste trabalho.

4.1.2. Fase exponencial de crescimento

O meio A, cultivado na sala termostatzada, sob luminosidade de $0,62 \cdot 10^{16}$ quanta. $\text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, ou $102,9 \mu\text{mol f\acute{o}tons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, apresentou fase exponencial de crescimento claramente separada das outras fases (fig. 13). Esta fase compreendeu o período entre o 3º. e o 5º. dia após inóculo. Por outro lado, nos meios cultivados na incubadora (meios B-1 a B-3), sob luminosidade de $0,4 \cdot 10^{16}$ quanta. $\text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, ou $66,4 \mu\text{mol f\acute{o}tons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, as fases exponenciais são menos acentuadas (figs. 14 a 16) em relação à fase exponencial do meio A. Observa-se que a partir de 96 h a inclinação da

curva é mais acentuada, sendo este o período determinado para a execução dos experimentos de exposição.

4.1.3. Citotoxicidade do peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

A figura 17 apresenta a frequência (%) de células de *D. tertiolecta* móveis (critério utilizado para determinar células viáveis) após 1, 2 e 4 h de exposição a diferentes concentrações de H_2O_2 no escuro. Pode-se observar que após exposição à concentração de 0,25 mM a frequência de células móveis é semelhante à frequência de células móveis do controle em todos os períodos testados. Por outro lado, em exposições a 0,75 e 1 mM, a frequência de células móveis é significativamente menor que a frequência das células móveis do controle em todos os períodos testados ($p < 0,01$). A mobilidade das células apresenta uma relação dose- tempo- dependente.

A exposição por 1 h à concentração mais alta de H_2O_2 que resultou em frequência de células móveis iguais a do controle foi escolhida para o experimento preliminar de determinação das condições de eletroforese, ou seja, 0,5 mM de H_2O_2 . Na exposição a esta condição é possível provocar o dano no DNA das células sem comprometimento da mobilidade das mesmas.

4.1.4. Determinação das condições de eletroforese

A tabela II mostra a frequência (%) de células móveis após a exposição. Em todas as condições testadas há mais de 70% de células móveis.

A figura 18 mostra a variação no Índice de Danos de cometas de *D. tertiolecta* (controle e exposto a 0,5 mM de H_2O_2) em voltagens de eletroforese crescentes.

No experimento realizado, foi possível observar que em corridas de eletroforese a 0,88 V/cm não há diferença entre o ID dos cometas do controle e do tratamento. A 0,77 V/cm, o ID do tratamento é maior que o do controle, e finalmente a 0,7 V/cm, a diferença entre o ID do tratamento e do controle foi a maior encontrada, sendo que no tratamento, o ID é quase 2 vezes maior que o ID do controle. Em ambos os tratamentos, o aumento da voltagem aplicada durante a corrida de eletroforese resulta em aumento do ID. A condição escolhida para os experimentos com exposições a 4NQO e BAP foi de 0,7 V/cm.

4.1.5. Citotoxicidade da 4NQO

A figura 19 apresenta a frequência (%) de células de *D. tertiolecta* móveis após 1, 2 e 4 h de exposição a diferentes concentrações de 4NQO no escuro. Pode-se observar que a exposição ao solvente DMSO a 0,15% não afeta a frequência de células móveis em nenhum dos períodos de exposição.

A exposição de *D. tertiolecta* a 4NQO apresenta uma relação dose- tempo-dependente na frequência de células móveis, assim como a exposição a H₂O₂ (fig. 17). Nas exposições por 1 h, observa-se que a partir de 7,5 µM de 4NQO, a frequência de células móveis é significativamente menor que a mesma frequência de células expostas ao solvente ($p < 0,01$). Nas exposições por 2 h, esta diminuição ocorre em exposições a partir de 2,5 µM ($p < 0,05$), sendo mais significativa a partir de 5 µM ($p < 0,01$) de 4NQO. Finalmente, nas exposições por 4 h, esta diminuição ocorre a partir de 1 µM ($p < 0,05$), sendo mais significativa a partir de 2,5 µM ($p < 0,01$) de 4NQO.

A concentração de 1 µM de 4NQO foi escolhida como a concentração mais alta a ser testada nos experimentos com ensaio cometa por se tratar de uma concentração que ainda apresenta alta frequência de células móveis em todos os períodos de exposição testados.

4.2.Exposição à 4NQO

4.2.1. Experimento 1

A tabela III mostra a frequência de células móveis (%) após 1 h de exposição às diferentes concentrações de 4NQO no escuro. A frequência de células móveis após a exposição é maior que 85% em todos os casos. As figuras 20 e 21 apresentam imagens dos cometas corados com BrEt e prata respectivamente, em diferentes graus de danos no DNA. Observa-se que nos cometas de maior dano (fig. 20- classe 4 e fig. 21- classe 4), o DNA apresenta-se altamente difuso.

A figura 22 mostra o momento da cauda e o comprimento de cauda dos cometas dos dois ensaios realizados como réplicas.

Em ambos os casos, os momentos de cauda dos cometas de todas as concentrações testadas de 4NQO são significativamente maiores que os do controle e do solvente (DMSO). Não há diferença significativa entre os momentos de cauda dos cometas do controle e dos cometas do solvente. No ensaio I, as exposições de 0,5 e 1 µM tendem a apresentar valores de momento da cauda mais baixos que na exposição de

0,25 μM , e no ensaio II, tal fenômeno ocorre na concentração de 1 μM . Os dados de comprimento de cauda da figura 22 são os mesmos dos apresentados na figura 23 e estão comentados a seguir. A repetição destes dados foi feita para facilitar a discussão mais adiante.

A figura 23 mostra os comprimentos das caudas dos cometas de dois ensaios (réplicas), corados com BrEt e posteriormente com prata. No ensaio I, em ambas as colorações, os comprimentos das caudas dos cometas de todas as concentrações testadas de 4NQO são significativamente maiores que os dos cometas do controle e do solvente. Já no ensaio II corada com BrEt, somente as células expostas às concentrações de 0,25 e 0,5 μM formaram cometas com comprimento de cauda significativamente maiores que os dos cometas do controle e do solvente, enquanto que na coloração com prata, todos os cometas de células expostas a 4NQO apresentam comprimentos de cauda significativamente maiores que os dos cometas do controle e do solvente.

As figuras 24 e 25 apresentam o número de células encontradas em cada classe de dano após a exposição a 4NQO, coradas com BrEt e prata respectivamente. Em ambas as colorações, observa-se que as condições de controle e solvente têm mais cometas identificados como classe 0. Nas exposições a 0,25 μM , o número de cometas em cada classe é praticamente o mesmo, e nas exposições a 0,5 e 1 μM , o número de cometas na classe 4 é maior. Além disso, observa-se heterogeneidade das respostas das células ao contaminante, uma vez que há cometas classificados como sem dano (classe 0) mesmo nas exposições às concentrações mais altas de 4NQO. A tabela IV mostra o ID calculado para cada exposição.

4.2.2. Experimento 2

A tabela V mostra a frequência de células móveis (%) após a exposição. Em todas as condições testadas há mais de 90% de células móveis.

A figura 26 apresenta os dados de momento da cauda de *D. tertilecta* exposta a 4NQO por 1, 2 e 4 h. Nas exposições de 1 h, o momento de cauda dos cometas das células expostas à concentração de 4 nM de 4NQO são significativamente maiores que o do controle e do solvente. Nas exposições de 2 h, em um dos ensaios (IV-2h) foi possível observar momentos de cauda significativamente maiores em condições tratadas com 4 e 20 nM de 4NQO quando comparadas com momentos de cauda dos cometas do solvente. Neste mesmo ensaio, o momento de cauda dos cometas do controle é alto,

sendo diferente significativamente do momento de cauda dos cometas do solvente. No outro ensaio do mesmo tempo de exposição (III-2h), não há diferença significativa entre os momentos de cauda dos cometas das células expostas a 4NQO e os dos cometas das células expostas ao solvente. No ensaio V (exposição de 4 h), não há diferença significativa entre momentos da cauda de cometas de nenhuma das condições testadas. E finalmente, no ensaio VI, pode-se observar que células expostas a 4 nM de 4NQO formaram cometas com momento da cauda significativamente maior que o de cometas de células expostas ao solvente.

As figuras 27, 28 e 29 apresentam o número de células encontradas em cada classe de dano após a exposição a 4NQO por 1, 2 e 4 h, respectivamente. Neste experimento, pouquíssimos cometas com dano máximo (classe 4) são observados. A tabela VI mostra o ID calculado para cada exposição.

4.2.3. Correlação entre ID e parâmetros obtidos pelo *software* de análise de imagens

A figura 30 mostra as linhas de regressão de momento de cauda, comprimento da cauda e porcentagem de DNA na cauda *versus* ID. Observa-se que dentre as regressões sem ajuste, ou seja, incluídos dados obtidos de lâminas com excesso de cometas considerados como *ghosts*, cujas imagens não são adequadas para análise através do *software* (fig. 30, A-1 a A-3), o coeficiente de determinação (R^2) da regressão de porcentagem de DNA na cauda *versus* ID é o mais alto (fig. 30, A-3; $R^2 = 0,62$). Após ajuste com exclusão dos dados de lâminas com excesso de *ghosts* (a saber, exposições a 0,5 e 1 μ M de 4NQO) (fig. 30, B-1 a B-3), observa-se que todas as regressões ficam melhor correlacionadas, com $R^2 > 0,75$ em todos os casos. Após este ajuste, a regressão de comprimento de cauda *versus* ID tem o $R^2 = 0,86$, sendo este o R^2 mais alto (fig. 30, B-2).

4.3. Exposição ao BAP

A tabela VII mostra a frequência de células móveis (%) após a exposição. Em todas as condições testadas há mais de 90% de células móveis.

A figura 31 apresenta os momentos da cauda de células de *D. tertiolecta* expostas ao BAP por 1, 2 e 4 h. Na exposição de 1 h, não foi observada diferença

significativa entre os momentos de cauda de grupos expostos às diferentes concentrações de BAP e os de controle e de solvente. Na exposição de 2 h, o momento de cauda do controle é significativamente maior que o do solvente e de células expostas a 0,4 e 10 μM de BAP. Na exposição de 4 h, o momento de cauda das células expostas ao solvente, assim como das células expostas a 0,4 e 10 μM de BAP são significativamente maiores que o momento de cauda do controle. Neste tempo de exposição, no entanto, não foram observadas diferenças significativas entre o momento de cauda das células expostas a 0,4 e 10 μM de BAP e o momento de cauda das células expostas ao solvente.

A figura 32 apresenta o número de células encontradas em cada classe de dano após a exposição ao BAP por 1, 2 e 4 h. A tabela VIII mostra o ID calculado para cada exposição.

5. DISCUSSÃO

5.1. Estabelecimento de condições experimentais

5.1.1. Escolha da espécie e teste de lise

Nas algas, além das membranas celulares típicas de células animais e das paredes celulares similares às dos vegetais superiores, encontra-se uma variedade de outros tipos de cobertura celular. Algumas, como a película e a teca, são características de classes únicas, enquanto outras são encontradas em várias classes. Em alguns organismos diferentes tipos de cobertura celular são encontrados em diferentes estágios do ciclo de vida. As células *naked*, sem parede celular, são encontradas nas classes Chlorophyceae, Xanthophyceae e Phaophyceae como zoósporos, na classe Bacillariophyceae como gametas, e na classe Eustigmatophyceae como zoósporos e gametas. Em todos os casos eles são estágios curtos, e em zoósporos, o assentamento é seguido de imediata secreção da parede celular. Porém, existem algas em que as células vegetativas são do tipo *naked*. É o caso de membros de Chloromonadophyceae, alguns gêneros como a *Dunaliella* (Chlorophyceae), e sob algumas condições, de *Ochromonas* (Chrysophyceae). Essas algas são circundadas somente pela sua membrana celular normalmente de 7 ou 8 nm de espessura, e com possibilidade de material proteináceo pelo lado de fora (Dodge, 1973). Para fins de lise celular, as algas *naked* são as mais semelhantes às células animais, nas quais o ensaio cometa já foi aplicado inúmeras vezes e com diferentes espécies. Devido a esta semelhança, foram selecionadas algas do Banco de Microorganismos Marinhos do IOUSP que tivessem este tipo de cobertura celular para que os testes de lise tivessem maior chance de êxito.

Dentre as quatro microalgas em que ocorreu a lise celular (*D. tertiolecta*, Cryptophyceae, *T. gracilis* e *Tetraselmis* sp.), tiveram preferência as que estavam identificadas até o nível de espécie. Assim, restaram *D. tertiolecta* e *T. gracilis*. Ambas são algas bem estudadas, porém, *D. tertiolecta* apresentou maior facilidade experimental, já que suas células foram lisadas em todas as condições de lise testadas (fig. 5). No caso de *T. gracilis*, mesmo em lises de 2 h na SLAI, nem todas as células apresentaram lise celular (figs. 11 e 12). Este padrão de resposta às condições de lise, apresentadas por *Tetraselmis* sp. e *T. gracilis* provavelmente está relacionado ao fato de elas estarem em outra fase que não na fase logarítima, pois já haviam se passado 25 dias

da repicagem das duas cepas. Neste caso, é provável que se a composição da parede celular das células desta espécie muda dependendo da fase em que a cultura se encontra, tal característica influenciou nos resultados da lise, em que algumas células estariam suscetíveis à solução de lise, e outras não. É possível que se fossem utilizadas culturas de *T. gracilis* em fase exponencial, a resposta à lise das algas desta espécie fosse menos variável.

A SLSA é a solução usada mais frequentemente no ensaio cometa (Fairbairn *et al.*, 1995). Apesar disso, comparando-se as duas soluções de lise testadas nas oito espécies de microalgas, a SLAI parece ser a mais eficiente, pois mesmo com as lâminas imersas por pouco tempo (5 min.), esta solução foi capaz de lisar (completa ou parcialmente) quatro das microalgas testadas, enquanto que a SLSA lisou somente duas. De fato, para microalgas, esta solução de lise tem tido bons resultados, já tendo sido usada em *Chlamydomonas reinhardtii* (Erbes *et al.*, 1997), *Euglena gracilis* (Aoyama *et al.*, 2003), *Closterium ehrenbergii* (Ciniglia *et al.*, 2005) e surpreendentemente, na diatomácea *Chaetoceros tenuissimus* (Desai *et al.*, 2006). Exceto no trabalho de Reiss & Rutz (1999), que usaram lise alcalina semelhante, com 2% DSS e 1M de uréia para células de linfoblasto (*apud* Bednarek *et al.*, 2006), não foram encontrados trabalhos que utilizassem SLAI para outros tipos celulares que não fossem microalgas.

Assim, *D. tertiolecta* foi escolhida dentre as algas do Laboratório de Microorganismos Marinhos do IOUSP para o estabelecimento das condições experimentais do ensaio cometa. Além disso, *D. tertiolecta* apresenta-se como a escolha adequada para os propósitos deste trabalho pois em termos de sensibilidade a compostos tóxicos, *D. tertiolecta* é uma espécie já utilizada nas avaliações de toxicidade (Cheung *et al.*, 1997) e foi usada com sucesso em estudos de bioacumulação de metais (Saçan & Balcıoğlu, 2001).

5.1.2. Fase exponencial de crescimento

As curvas de crescimento (A e B-1, B-2 e B-3) foram feitas em locais distintos pois a partir do mês de dezembro de 2006, devido às altas temperaturas apresentadas ao longo do dia, a sala de cultura do Banco de Microorganismos Marinhos do IOUSP passou a sofrer problemas de oscilação de temperatura, chegando a registrar temperaturas 10 °C acima do ideal. Esta oscilação fez com que os meios de cultura ali mantidos tivessem sua curva de crescimento alterada. No caso de *D. tertiolecta*, a fase

estacionária foi alcançada em período inferior a 3 dias. As providências a serem tomadas envolviam uma reforma na sala de cultura, sem previsão para ser feita. Desta forma, a solução mais rápida encontrada foi a transferência dos meios de cultura para uma incubadora, também do Banco de Microorganismos Marinhos do IOUSP. As condições de manutenção das culturas na sala de cultura e na incubadora são basicamente as mesmas, alterando-se somente a intensidade luminosa devido ao número e disposição de lâmpadas. Esta alteração de intensidade luminosa, no entanto, parece ter afetado a curva de crescimento de forma significativa, como será discutido a seguir.

A curva de crescimento obtida para *D. tertiolecta* no meio A (fig. 13) está de acordo com as curvas normalmente obtidas para algas marinhas mantidas em cultivo (Guillard, 1973). No caso específico de *D. tertiolecta*, Fabregas *et al.* (1986), verificaram que nas suas culturas de *D. tertiolecta*, após uma fase de indução de 2-3 dias, a fase exponencial durava 4, 5, 6 e 10 dias para culturas com 2, 4, 8 e 16 mM de NaNO_3 , respectivamente (em condições de luz não limitantes para o crescimento, mesmo considerando o efeito de sombra). No meio A, após uma fase de indução de 2,5 dias, a fase exponencial durou cerca de 3 dias, com a concentração de NaNO_3 de 0,9 mM. A duração da fase exponencial e a concentração de NaNO_3 são menores, porém coerentes com os dados apresentados por Fabregas *et al.* (1986). A concentração de 0,9 mM NaNO_3 é a comumente usada no Laboratório de Microorganismos Marinhos do IOUSP na preparação dos meios de cultura, e durante a elaboração dos experimentos, optou-se por manter as microalgas em condições de crescimento que fossem o mais semelhante possível das condições rotineiramente utilizadas no mesmo Laboratório.

Por outro lado, nos meios B-1 a B-3 (figs. 14 a 16), a curva no trecho de fase exponencial está menos inclinada, dificultando a visualização e identificação das diferentes fases do crescimento da cultura.

A razão para tal diferença parece ter sido causada pela diferença na irradiância. Na sala termostatzada, os meios de cultura ficavam sob iluminação de $102,9 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}\text{s}^{-1}$, enquanto que na incubadora, sob luminosidade de $66,4 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

D. tertiolecta é um fotoautótrofo obrigatório, aparentemente muito sensível a alterações de condições luminosas. Estas algas não podem usar compostos orgânicos dissolvidos, e não se reproduzem sexualmente em cultura. Sob condições de cultura normais, fornecendo-lhes somente nutrientes inorgânicos e luz, *D. tertiolecta* é “imortal”, ou seja, as células dividem por simples fissão binária sem nenhuma evidência de lise celular, encistamento ou formação de esporos (Segovia *et al.*, 2003). *D*

tertiolecta é conhecida por sua alta tolerância ao estresse salino, à alta luminosidade e a relativamente altas temperaturas. Quando colocadas no escuro, porém, as culturas de células passam por morte celular catastrófica entre o 4º. e o 6º. dia (Berges & Falkowski 1998). Dados de Quigg *et al.* (2003) mostram que ela tem um ponto de compensação fótica para crescimento por volta de $20 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}\text{s}^{-1}$. A irradiância na sala termostatzada é 5,1 vezes maior que o seu ponto de compensação fótica, enquanto que na incubadora, é somente 3,3 vezes maior. A taxa de crescimento porém está bem distante da saturação, uma vez que seriam necessários $150 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ com iluminação contínua para que esta seja atingida (Quigg *et al.*, 2003), e nos experimentos realizados o ciclo de claro/escuro sempre foi mantido em 12h:12h. Além disso, em um protocolo para padronização de testes de toxicidade de efluentes da Nova Zelândia, que usa *D. tertiolecta* como organismo para testes de toxicidade, a recomendação é de que as algas sejam incubadas a 20°C sob luz fria branca contínua, com intensidade de $200 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PAR (radiação fotossinteticamente ativa) na superfície do frasco (Hall & Golding, 1998), indicando mais uma vez que a intensidade luminosa utilizada na incubadora foi insuficiente para o crescimento da cultura de forma a obter uma curva com os pontos de inflexão bem marcados entre as diferentes fases.

A irradiância insuficiente também causa outros efeitos além da curva de crescimento alterada em *D. tertiolecta*. Após somente 1 dia no escuro, células de *D. tertiolecta* já apresentaram algum grau de fragmentação de DNA (Segovia *et al.*, 2003), observado através de marcação fluorescente nos terminais 3'OH do DNA. As alterações decorrentes do regime de luz também se manifestam na morfologia celular. Nas células que cresciam ativamente na luz, Segovia *et al.* (2003) observaram que a membrana nuclear estava bem definida, e a cromatina estava localizada no nucléolo. Quando colocada no escuro, porém, observava-se o início de condensação de cromatina com 1 dia de escuro. Após 4 dias, o núcleo é completamente perdido com subsequente lise celular.

Por outro lado, *D. tertiolecta* é descrita como uma espécie resistente à alta luminosidade. Essa resistência talvez se deva ao fato de *D. tertiolecta* sintetizar e acumular enormes quantidades do pigmento β -caroteno, como as algas do mesmo gênero, *D. salina* e *D. bardawil* (Henriques *et al.*, 1998). Nas células vegetais, aparentemente o β -caroteno tem a função de proteger o aparelho fotossintético de fenômenos de fotoxidação, desencadeados por um eventual excesso de luz. Na presença de luz forte, as clorofilas produzem níveis elevados de espécies reativas de oxigênio

(ERO), tais como peróxidos e radicais de oxigênio. As ERO podem reagir com lipídios membranares, dando origem a radicais e peróxidos lipídicos. Estes produtos tóxicos, por sua vez, geram reações de (per)oxidação em cadeia, que podem afetar inclusivamente o material genético das células. A ação anti-oxidante do β -caroteno parece centrar-se no atenuamento da ação dos radicais de oxigênio nas membranas celulares, reagindo com os radicais lipídicos gerados pelas ERO, inibindo deste modo a reação de oxidação em cadeia (Havaux, 1998). As propriedades anti-oxidantes do β -caroteno são atribuídas à sua estrutura. Trata-se de uma molécula constituída por uma longa cadeia de 11 ligações duplas alternadas. Estas permitem a absorção da energia das ERO (ou o composto intermediário gerado por estas), canalizando-a através da longa cadeia de ligações duplas que se encontram em ressonância (Tsuchihashi *et al.*, 1995). A energia é finalmente libertada sob a forma de calor, voltando a molécula de β -caroteno ao seu estado original.

Para os fins experimentais, os meios cultivados na incubadora foram utilizados sempre no 4º dia após a inoculação, mantendo o padrão utilizado nos meios cultivados na sala termostaticada, e coincidindo com o dia em que a curva é mais inclinada.

5.1.3. Citotoxicidade do peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

Os testes de viabilidade de *D. tertiolecta* utilizando-se de corantes específicos como o azul de metileno não tiveram resultados satisfatórios, provavelmente devido à cor verde predominante na célula. Outra alternativa seria o uso de corantes fluorescentes como o iodeto de propídio, usado por Abalde *et al.* (1995) para verificar a viabilidade de *D. tertiolecta*. Este corante indica a viabilidade celular devido a sua incapacidade de atravessar membranas celulares intactas. Quando a célula morre ou a membrana está danificada, o iodeto de propídio entra na célula e se liga seletivamente aos ácidos nucleicos. Utilizando-se de um citômetro de fluxo, as medições de viabilidade são feitas rapidamente com o uso deste corante. Pode-se também analisar células coradas com iodeto de propídio com microscópio de epifluorescência. Na ausência destes equipamentos e aproveitando-se do fato de *D. tertiolecta* ser uma espécie de microalgas móveis, uma alternativa prática e rápida encontrada foi avaliar o efeito citotóxico através da frequência de células móveis em termos de porcentagem do total de células presentes. Apesar de ser possível que uma célula imóvel esteja viável (somente perdeu os flagelos e, portanto, a capacidade de natação), todas as células móveis são viáveis.

Desta forma, ao utilizarmos a frequência de células móveis como um indicador de viabilidade, temos um indicador conservador para a viabilidade das células nos meios de cultura.

A concentração de H_2O_2 escolhida para o estabelecimento das condições experimentais de eletroforese foi de 0,5 mM em exposições de 1 h. Esta concentração é alta quando comparada às concentrações utilizadas em ensaio cometa em células animais. Nestes protocolos, normalmente utiliza-se H_2O_2 a concentrações de 50 a 150 μM , ou seja, 0,05 a 0,15 mM (Visvardis *et al.*, 1997; Collins *et al.*, 1995). Por outro lado, nossos dados estão de acordo com o trabalho de Erbes *et al.* (1997), em que exposições no escuro da microalga *Chlamydomonas reinhardtii* a 0,5 mM de H_2O_2 apresentaram bons resultados. O H_2O_2 age no DNA causando quebras de fita dupla e simples, assim como bases alteradas. Os danos são causados através da formação de ERO como os superóxidos e os radicais hidroxila (Bernstein & Bernstein, 1991 *apud* Sastre *et al.*, 2001), sendo, portanto, uma ótima substância para determinação de condições experimentais do ensaio cometa.

5.1.4. Determinação das condições de eletroforese

A variação das condições de eletroforese alterou a sensibilidade do ensaio ao tratamento com H_2O_2 , indicando a influência da voltagem aplicada na formação de caudas dos cometas. Essa variação faz com que em um mesmo laboratório seja necessário o uso de voltagens distintas em ensaios cometa de espécies diferentes, como no trabalho de Andrade *et al.*, (2004), em que a eletroforese realizada em células sanguíneas de tainha foi de 0,7 V/cm e a realizada em células sanguíneas de bagre foi de 0,9 V/cm.

Apesar da corrida a 0,7 V/cm ter resultado em menor índice de danos no controle quando comparado às demais voltagens, aparentemente o índice de danos médio desta condição é ainda alto se considerarmos que a sua escala vai de 0 a 400. Porém, em um artigo para definir *guidelines* na execução do ensaio cometa, um grupo de pesquisadores de diferentes partes do mundo (Tice *et al.*, 2000) recomenda que as condições ótimas de eletroforese sejam tal que as células do controle exibam alguma migração. Desta forma, esta migração vai fornecer informações úteis na avaliação intralaboratorial da variabilidade entre experimentos. Além disso, cometas de controles com um mínimo de migração são essenciais no estudo de situações em que há um

retardo na taxa de migração de DNA, como quando há *cross-linking* entre DNA-DNA ou DNA- proteína, produzido por exemplo por muitos agentes quimioterapêuticos (Fairbairn *et al.*, 1995). Assim, a condição de 0,7 V/cm é adequada para os experimentos subsequentes.

O ajuste das condições de eletroforese para aumento da sensibilidade do ensaio não se restringe à voltagem aplicada, sendo possível variar também a duração da corrida e a amperagem. Sastre *et al.* (2001) compararam a sensibilidade de diferentes durações de corrida de eletroforese (30 e 60 min.) nas microalgas *Rhodomonas* sp. tratadas com 0,1 mM de H₂O₂ por 15 min., e verificaram que nas corridas de 60 min. (12V, 185 mA) o ensaio apresentava maior sensibilidade, sendo esta a condição escolhida para os experimentos destes autores.

O ID se mostrou eficiente para diferenciação dos danos no DNA de *D. tertiolecta* expostos a H₂O₂. O H₂O₂ é um intermediário comum em uma variedade de estresses oxidativos. Ele não interage diretamente com o DNA, mas após a chamada reação de Fenton, o radical hidroxila gerado (OH·) interage com a cromatina gerando quebras na fita, sendo por isso usado em muitos laboratórios como controle positivo do ensaio cometa (Fairbairn *et al.*, 1995). Em linfócitos tratados com H₂O₂, há uma clara correlação entre os dados gerados pelo escore visual e os dados de porcentagem de DNA na cauda do cometa gerados pelo *software* de análise de imagens (Comet 2.2, da Kinetic Imaging Ltd., Liverpool, Reino Unido) (Collins *et al.*, 1995). Desde então, o sistema de ID tem sido usado por muitos autores em seus trabalhos de cometa, como por exemplo em células de mexilhões (Villela *et al.*, 2006), de peixes (Andrade *et al.*, 2004), de roedores (Silva *et al.*, 2000) e de humanos (Oliveira *et al.*, 2001). Alguns autores utilizaram variações deste tipo de análise, como por exemplo Gedik *et al.* (1992), Kammann *et al.* (2000) e Lemos *et al.* (2005) que classificaram os cometas em 4 categorias (0-3), obtendo também bons resultados. Em microalgas, não foram encontrados trabalhos que utilizassem o ID no ensaio cometa.

5.1.5. Citotoxicidade da 4NQO

As recomendações internacionais (USEPA, OECD – *Organization for Economic Cooperation and Development* - , ASTM – *American Society for Testing and Materials* - e APHA – *American Public Health Association*) em relação aos limites aceitáveis de solvente nos testes de toxicidade em organismos aquáticos são variáveis,

indo desde 0,1 ppm para testes de fluxo contínuo até 500 ppm para testes agudos, baseados em experimentos com peixes e invertebrados (Hughes & Vilkas, 1983 *apud* Okumura *et al.*, 2001). Porém, em testes com algas, é freqüente o uso de concentrações de solvente maiores que os máximos permitidos pelas recomendações internacionais devido ao pequeno volume do teste, à solubilidade do composto tóxico e outras limitações técnicas (Stratton & Smith, 1988 *apud* Okumura *et al.*, 2001). A concentração usada de DMSO nos testes de citotoxicidade do nosso trabalho foi de 0,15% ou seja, 1.500 ppm. Apesar deste valor ser pelo menos 3 vezes maior que as recomendações internacionais para organismos aquáticos, a exposição das microalgas ao DMSO não causou efeitos citotóxicos nas condições estudadas quando comparada ao controle. Esses dados estão de acordo com os dados obtidos por Okumura *et al.* (2001), que determinaram o valor de CENO (concentração de efeito não observável) de DMSO para *D. tertiolecta* como sendo de 9.900 ppm. Comparando-se os efeitos de diversos solventes (etanol, metanol, acetona, dimetilformamida – DMF - e DMSO) em diversas espécies de algas marinhas, estes autores concluíram que na maioria dos casos, o DMSO é o que apresenta a menor toxicidade. Lemée *et al.* (1997) também optaram por usar DMSO como solvente de extratos orgânicos da alga verde *Caulerpa taxifolia* para testes de toxicidade em microalgas. Estes autores relatam que o etanol era tóxico a uma concentração de 10 ppm, enquanto que o DMSO não afetou o crescimento mesmo com a concentração alta de 2.500 ppm.

A exposição das algas por 4 h à 4NQO resultou em efeitos citotóxicos em concentrações de 1 μ M (fig. 19). Este valor é bem próximo ao encontrado por Valentin-Severin *et al.* (2003), que determinaram que em células de hepatoma humano em exposições de 4 h o valor de CI50 para 4NQO era de 1,9 μ M.

5.2.Exposição à 4NQO

5.2.1. Experimento 1

Um dos primeiros aspectos a ser notado nas imagens de cometa de *D. tertiolecta* (figs. 20 e 21) é a diferença no aspecto geral dos cometas quando comparados às imagens de cometas de células de vegetais superiores (Khan *et al.*, 2005 e Liu *et al.*, 2004 para coloração com prata; Navarrete *et al.*, 1997 para coloração com BrEt), de invertebrados (Villela *et al.*, 2006 para coloração com prata e Dixon *et al.*, 2002 para coloração com BrEt), de peixes (Di Paolo, 2006 para coloração com prata e

Kamer & Rinkevich, 2002 para coloração com BrEt) e de humanos (García *et al.*, 2004 para coloração com prata e Oliveira *et al.*, 2001 para coloração com BrEt). Erbes *et al.* (1997) também observaram diferenças na morfologia de cometas de *Chlamydomonas reinhardtii* coradas com BrEt, quando comparadas com cometas de células animais. Neste trabalho, estes autores descrevem os cometas classe 0 como fragmentos de DNA espalhados de forma difusa na área que anteriormente era ocupada pelo núcleo. Por outro lado, cometas classe 0 de células de animais e de vegetais superiores aparecem como um núcleo compacto e distinto. Esta diferença provavelmente se deve à quantidade de DNA presente em cada célula. Fabregas *et al.* (1986) verificou que o nível de DNA/célula de *D. tertiolecta* variava de 0,05 a 0,12 pg/célula, sendo esta variação independente de variações nas concentrações de nutrientes ou fase (comparando-se fase exponencial e estacionária). Esses valores são menores do que os apresentados por *Tetraselmis suecia* e similares a microalgas marinhas menores, como *Monochrysis lutherii* e *Navicula pelliculosa*, que contêm aproximadamente 0,1 pg DNA/célula (Holm-Hansen, 1969). Uma célula somática de um ser humano, por outro lado, contém cerca de 6 pg de DNA (Friz, 1968 *apud* Holm-Hansen, 1969), quase 2 ordens de grandeza acima dos valores descritos para *D. tertiolecta* por Fabregas *et al.* (1986). Uma célula de cebola contém ainda mais DNA que uma célula humana, sendo 33 pg/célula diplóide, e conseqüentemente cometas de cebola são quase 2 vezes maiores que os cometas de humanos (Navarrete *et al.* 1997).

É importante lembrar que em células fotoautotróficas, além do DNA nuclear e mitocondrial, há também o DNA dos cloroplastos. Porém, a quantidade de DNA destas duas organelas somadas geralmente representam uma pequena porcentagem do DNA total da célula. Por exemplo, em *Euglena gracilis* e em *Chlamydomonas reinhardtii*, o DNA nuclear corresponde respectivamente a mais de 90% e a 86% do DNA total (Edelman *et al.*, 1966 *apud* Holm-Hansen, 1969; Erbes *et al.*, 1997), sendo o DNA nuclear, portanto, o responsável pela maior parte dos danos de DNA analisados.

Nas exposições de 0,5 e 1 μ M de 4NQO, muitos dos cometas analisados aparecem com completa desintegração da região da cabeça, enquanto a cauda aparece como uma nuvem de fragmentos de DNA com baixa fluorescência. Neste caso, devido a alta fragmentação do DNA, a fluorescência é baixa e o programa CometScore não obteve contraste suficiente para analisar a imagem corretamente. Desta forma, a aparente diminuição dos danos de DNA apresentados na forma de momento da cauda destes cometas é provavelmente resultante de um artefato de técnica, e não de um

menor dano no DNA das células expostas a estas concentrações de 4NQO, como se pode observar pela maior quantidade de cometas classe 4 nestas duas condições (fig. 24). Os cometas com DNA altamente difuso não analisáveis eficientemente pelo *software* de análise de imagem provavelmente é causado pela pequena quantidade de DNA de microalgas. A presença destes cometas foi também observada por Erbes *et al.* (1997), que os denominaram de *ghosts*. Estes *ghosts*, no entanto, não correspondem a células mortas. Muitos pesquisadores concluíram que, baseado na aparência característica dos cometas, as células apoptóticas poderiam ser distinguidas das células necróticas no ensaio cometa alcalino (Fairbairn *et al.*, 1996 *apud* Tice *et al.*, 2000; Bednarek *et al.*, 2006). As células apoptóticas formariam cometas com uma grande cauda em forma de leque e pequenas cabeças (chamados de *hedgehogs* ou “porco-espinho”), enquanto as células necróticas formariam cometas com cabeças relativamente grandes e caudas estreitas de variados tamanhos (indistinguíveis dos cometas resultantes de danos genotóxicos). Este tipo de diferenciação tem sido usado por muitos autores no estudo da apoptose (Husseini *et al.*, 2005) e também nos estudos genotoxicidade, excluindo-se os cometas *hedgehogs* como garantia de que o aumento nos danos de DNA tenha sido causado por efeitos genotóxicos e não citotóxicos (Rank & Jensen, 2003). Porém, esta diferenciação parece não ser muito precisa. Por exemplo, sabe-se que a apoptose é irreversível, no entanto células com danos revelados como cometas *hedgehogs* (após tratamento com H₂O₂ em concentrações subletais) podem ser reparadas, de forma que os *hedgehogs* não são mais vistos (Collins *et al.*, 1995). Além disso, a apoptose é caracterizada pela fragmentação do DNA no tamanho de oligômeros de nucleossomos. Pedacos de DNA pequenos como esses certamente desapareceriam do gel durante a lise ou eletroforese (Collins, 2004). Tratando duas linhagens de linfócitos (sendo uma propensa a apoptose e outra resistente) com citotoxinas não genotóxicas indutoras de apoptose e necrose e com genotoxinas, Meintières *et al.* (2003) não encontraram correlação entre presença de células apoptóticas ou necróticas com formação de *ghosts* (no trabalho de Meintières, *ghosts*, *clouds*, *hedgehogs* e NDCN – *nondetectable cell nuclei* são tratados como sinônimos). Os nossos dados de mobilidade de *D. tertiolecta*, após a exposição a estas concentrações, não deixam dúvidas quanto à viabilidade das mesmas, confirmando a não correlação da formação de *ghosts* com o número de células apoptóticas. Esta ausência de correlação também foi descrita em cometas de microalgas por Erbes *et al.* (1997), em doses de 4NQO que excedem 100 nM por 2 h. Reconhecendo esta falha na diferenciação dos cometas, Morley *et al.* (2006) adaptaram

o ensaio cometa para o chamado *apo/necro-comet assay*, no qual é possível a distinção de cometas de células viáveis, apoptóticas e necróticas com o uso do corante Annexina-V e do teste de exclusão de corante em células já embebidas na agarose.

O DMSO, usado na concentração de 0,15% (1.500 ppm), além de não causar efeitos citotóxicos como discutido no item 5.1.5, não causou efeitos genotóxicos em *D. tertiolecta*. Erbes *et al.* (1997) usaram DMSO a 0,3% (3.000 ppm) em exposições de 2 h em *Chlamydomonas reinhardtii* e também não observaram efeitos genotóxicos deste solvente.

Ao comparar nossos resultados de cometa de *D. tertiolecta* expostos por 1 h a 4NQO (fig. 22) com resultados de cometa em outros organismos ou células, podemos observar que *D. tertiolecta* possui alta sensibilidade. Ela apresentou maior sensibilidade que crustáceos (embriões de camarão, 2 μ M por 24 h) (Kim & Lee, 2004), que fibroblastos humanos (1 μ M por 1 h) (Hömmle *et al.*, 2000), que células de hepatoma humano (1 μ M por 4 h) (Valentin-Severin *et al.*, 2003) e que ratos (0,26 mM por 4 semanas, administrado oralmente) (Ribeiro *et al.*, 2004). Por outro lado, dados de Miyamae *et al.* (1997) mostraram que células de ovário de hamster chinês são sensíveis à exposição por 1 h de 0,14 μ M de 4NQO e de Erbes *et al.* (1997) mostraram que cometas de *Chlamydomonas reinhardtii* expostas por 2 h a 25 nM de 4NQO possuem momentos de cauda significativamente mais altos que os do controle, sendo que a partir de 100 nM, os cometas já apresentam-se como *ghosts*.

No ensaio II, com cometas corados com BrEt (fig. 22), pode-se observar que, de acordo com os dados de momento de cauda, a exposição das microalgas a 1 μ M de 4NQO induz danos significativamente maiores do que os observados no controle. Por outro lado, de acordo com os dados de comprimento de cauda, apesar de terem sido analisados os mesmos cometas, este padrão não se repete. Este resultado pode ter sido causado pelo fato dos cometas apresentarem-se como *ghosts* nesta concentração. Uma vez que a cabeça não é corretamente identificada, o comprimento da cauda também será calculado erroneamente. Apesar do parâmetro momento de cauda utilizar os dados de comprimento da cauda no seu cálculo, ele também utiliza os dados de porcentagem de DNA na cauda, o que provavelmente compensou o cálculo errado do comprimento de cauda de *ghosts*. Além disso, é possível que esta diferença se deva à maior sensibilidade do parâmetro momento de cauda para detectar danos no DNA. Isto se deve novamente ao fato do momento da cauda ser calculado considerando a porcentagem de DNA na cauda, este, por sua vez, calculado através da sua intensidade de fluorescência (segundo

manual do Tritek CometScore). De acordo com Gedik *et al.* (1992), o aumento na intensidade de fluorescência da cauda do cometa, ao invés do comprimento da cauda, é o efeito predominante com o aumento na frequência de quebras de DNA, que é o efeito esperado em consequência do relaxamento de mais e mais alças de DNA por quebras na fita. O comprimento de cauda aumenta com o aumento da dose dos compostos genotóxicos, porém Fairbairn *et al.* (1995) atentam para o fato de que esta relação é mais direta quando os danos no DNA são mínimos e uma baixa dose é usada.

No caso cometa com microalgas, quase todos os autores citados usam algum *software* de análise de imagem para avaliar os danos no DNA, e optam pelo momento de cauda como o parâmetro mais sensível. Mesmo com morfologia de cometa tão diferente quando comparada à morfologia de cometas de células animais, a classificação segundo índice de dano também parece ser uma ferramenta útil, como mostram os dados da tabela IV, que mostram tendência semelhante à dos dados de momento e comprimento de cauda. Desai *et al.* (2006) foram os únicos autores que usaram uma metodologia distinta para avaliar os danos de DNA. Eles classificaram os cometas como “sem dano” e “com dano” somente, e obtiveram uma curva dose- tempo dependente para exposições ao cádmio.

Na classificação segundo o grau de danos no DNA (figs. 24 e 25), observa-se cometas identificados como classe 0 mesmo nas lâminas de cometas de algas expostas à 4NQO, que, baseado em dados de momento de cauda e comprimento da cauda (fig. 22), estatisticamente apresentam mais danos que os de algas expostas ao solvente. A presença destes cometas classe 0 mostra a heterogeneidade da resposta de uma população de células à exposição ao contaminante. A variabilidade dessa resposta pode ser resultante da variabilidade na capacidade metabólica, na capacidade de reparo de DNA, entre outros (Mitchelmore & Chipman, 1998).

Os resultados de comprimento de cauda dos cometas corados com BrEt e posteriormente com prata são semelhantes (fig. 23), indicando que o *software* de análise de imagem pode também analisar cometas corados com prata, desde que tomadas as devidas precauções de não se usar parâmetros que dependam da intensidade de fluorescência. Uma variedade de corantes tem sido aplicado à coloração do DNA no ensaio cometa, como por exemplo os corantes fluorescentes BrEt, o DAPI (dicloreto de 4,6-diamino-2-fenil-indol), a laranja de acridina, o iodeto de propídio e o YOYO-1 (*benzoxazolium-4-quinolinum oxazole yellow homodimer*). Dentre os não fluorescentes, a coloração com prata (e suas inúmeras modificações) é a única descrita (Tice *et al.*,

2000). Em decorrência dessa variedade de corantes com mecanismos distintos de coloração, alguns autores coraram lâminas de mesmo tratamento com diferentes substâncias para comparação da eficiência das mesmas. Segundo Gichner *et al.* (2006), cometas corados com DAPI ou com YOYO-1 dão resultados de porcentagem de DNA na cauda semelhantes aos cometas corados em EtBr, podendo ser usados com a mesma eficiência. No entanto, para corantes fluorescentes, além da necessidade de um microscópio de epifluorescência de alta qualidade, com lâmpada de mercúrio de 100 W e com uma câmera acoplada (no caso do uso do *software* de análise de imagem), sabe-se que corantes fluorescentes como o EtBr são potenciais carcinogênicos (Singer *et al.*, 1999). Nadin *et al.* (2001) compararam a eficiência da coloração com iodeto de propídio e com prata, e observaram que analisados segundo o método de índice de danos, não há diferença entre cometas corados com iodeto de propídio, cometas corados com prata, e cometas corados com prata após coloração com iodeto de propídio.

A coloração com prata tem se mostrado específica para proteínas, lipopolissacarídeos e ácidos nucleicos. A estrutura do gel de agarose oferece condições favoráveis ao depósito de íons de prata, uma característica que resulta em alto *background* (Gottlieb & Chavko, 1987). Apesar disso, o método de coloração com prata em gel de agarose tradicional descrito por Gottlieb & Chavko (1987) produziu resultados consideravelmente mais sensíveis que o método de coloração por BrEt. A eficiência do padrão de coloração com prata varia de acordo com o tempo em que o gel fica imerso na solução de trabalho e com a concentração dos seus vários componentes (Gottlieb & Chavko, 1987). Apesar da segurança da coloração com prata em termos de toxicidade, a metodologia de coloração muitas vezes é descrita como trabalhosa e longa. De fato, no protocolo descrito por Cerda *et al.* (1997), a coloração é feita em temperatura ambiente e requer trocas de solução a cada 10-20 min. Muitos autores introduzem modificações no protocolo padrão de coloração com prata para reduzir o *background*, melhorar a sensibilidade e reduzir o trabalho e o tempo da técnica. Nas tentativas iniciais de coloração com prata realizadas em nosso laboratório com algas, era comum a troca de solução por pelo menos 2 vezes, porém, com a modificação de corar a 34°C, a redução da prata acelerou-se e, conseqüentemente, a troca entre soluções de trabalho foi feita a cada 5 min. Além disso, com apenas 1 troca, os cometas já eram bem visualizados, de forma que o tempo gasto com a coloração reduziu significativamente.

Os efeitos da 4NQO em 1 h foram detectados pelo ensaio cometa em exposições a 0,25 µM, enquanto que no teste de viabilidade estes efeitos só foram

observados em exposições a 5 μ M, havendo uma diferença de 20 vezes entre os limites de detecção de toxicidade dos dois testes. Obviamente, um teste de genotoxicidade deverá detectar concentrações de efeito observável mais baixos que testes de citotoxicidade, e, portanto, estes dados são os esperados. De uma forma geral, o ensaio cometa se apresenta como um teste bastante sensível em estudos de toxicidade. Ciniglia *et al.* (2005) usaram o teste inibição do crescimento, o teste de inibição de zigósporo e o ensaio cometa para estudar os efeitos de Triclosan (um desinfetante muito usado na indústria de produtos de cuidados pessoais) na microalga *Closterium ehrenbergii*. O ensaio cometa foi o mais sensível dos três testes, apresentando momentos de cauda significativamente maiores em concentrações quase 4 vezes mais baixas que as concentrações que resultaram em inibição de crescimento ou de zigósporo.

5.2.2. Experimento 2

Neste experimento, foram observados pouquíssimos cometas *ghosts*, demonstrando que a presença destes cometas está diretamente ligada a exposições de 4NQO em concentrações relativamente altas.

Nas exposições por 1 h, a exposição à concentração baixíssima de 4 nM de 4NQO causou danos no DNA de *D. tertiolecta* significativamente maiores do que os apresentados pelo controle e pelo solvente (fig. 26, I-1h e II-1h). Este resultado demonstra novamente a alta sensibilidade de *D. tertiolecta* aos efeitos genotóxicos da 4NQO, como já discutido no item anterior (5.2.1). Porém, nas exposições a 20 nM e 100 nM, ao invés de observarmos o aumento nos danos do DNA, como esperado, observamos uma diminuição deste dano. É possível que o reparo em *D. tertiolecta* expostos a 100 nM de 4NQO tenha sido rápido de modo a não apresentar danos segundo o parâmetro momento de cauda. Em células de mamíferos, é comum o uso de inibidores de reparo para que os danos no DNA sejam melhor visualizados pelo ensaio cometa. Apesar do reparo no DNA de organismos aquáticos ser lento comparado com células de mamíferos, (Espina & Weiss, 1995 *apud* Mitchelmore & Chipman, 1998), Aoyama *et al.* (2003) demonstraram que, simplesmente transferindo as microalgas *E. gracilis* para um meio sem contaminante, o reparo acontecia na primeira hora de incubação mesmo no escuro. Esta explicação parece ser pouco provável, uma vez que: (1) foram observados danos no DNA das células expostas a concentrações mais baixas; e (2) nossos dados do experimento 1 mostram que em exposições a 250 nM (0,25 μ M) o

DNA de *D. tertiolecta* está claramente danificado. No presente momento, não conseguimos explicar este resultado satisfatoriamente.

Tanto nas exposições por 2 h quanto na de 4 h (fig. 26, III-2h, IV-2h, V-4h e VI-4h), observa-se que a exposição de 4 nM também induziu maiores danos no DNA das células quando comparados com os danos observados nas células expostas ao solvente, confirmando os dados de exposição por 1 h. Nas exposições a concentrações mais altas, o padrão observado nas exposições por 1 h se repete. Os dados de ID (tabela VI) e de número de células encontradas em cada classe de dano (figs. 27 a 29) são coerentes com o padrão de danos descrito pela análise de momento de cauda.

As exposições por 2 e 4 h a 4NQO têm uma alta variabilidade entre os dados de momentos de cauda dos cometas das réplicas. Uma das razões para esta alta variabilidade apresentada nas réplicas pode ser a condição das culturas. Mesmo que as culturas usadas para os experimentos tenham sido da mesma idade, essa medida foi provavelmente insuficiente para obter culturas homogêneas e sincronizadas. Assim, diferenças podem ter sido causadas devido ao fato de as células estarem em diferentes estágios do ciclo celular. No caso de controles apresentando danos no DNA, como no ensaio IV-2h, é possível que um campo elétrico não homogêneo tenha levado a danos artificiais de DNA (Singh *et al.*, 1994). Além disso, dependendo da idade das células ou *status* do ciclo, é possível que algumas células nos grupos controle reajam mais sensivelmente ao tratamento do ensaio cometa que outras células (Erbes *et al.*, 1997), o que nos nossos dados poderia ser observado especialmente em exposições de 2 e 4 h. O status do ciclo celular influencia na estrutura da cromatina, que, por sua vez, afeta a formação de cometas (Olive & Banáth, 1993 *apud* Fairbairn *et al.*, 1995). Culturas não sincronizadas parecem ter sido também a causa da não homogeneidade da expressão dos genes de *T. pseudonana* expostas a diferentes HPAs no trabalho de Bopp & Lettieri (2007).

Além disso, é possível que algumas pequenas mudanças nas condições experimentais tenham levado as mudanças significativas nos resultados esperados.

A diferença no local de cultivo das algas (sala termostaticada ou incubadora) com irradiância diferente afetou não somente a curva de crescimento como já discutido no item 5.1.2, mas também a execução deste experimento. Entre a metodologia do experimento 1 e 2, além da diferença desejada das concentrações e do tempo de exposição a 4NQO, houve também diferenças em relação ao local de cultivo e à velocidade de centrifugação.

No experimento 1 (e em todas as outras suspensões do estabelecimento das condições experimentais), as algas foram cultivadas na sala termostatzada, com maior irradiância, e a suspensão após exposição foi preparada após centrifugação a 1.400 g por 15 min. Já no experimento 2, as algas foram cultivadas na incubadora, com menor irradiância, e a velocidade de centrifugação teve de ser aumentada para 3.000 g por 15 min. para a preparação da suspensão.

Provavelmente esta alteração foi necessária devido à diferença no tamanho das células cultivadas na incubadora. Ou seja, em condições de luz menos favoráveis, as algas provavelmente diminuíram de tamanho, alterando a velocidade de centrifugação necessária para sedimentá-las. Apesar de não terem sido feitas medições do tamanho de *D. tertiolecta* cultivadas nestas duas condições, sabe-se que há variação no tamanho das microalgas *Dunaliella marina* em condições de crescimento e intensidade luminosa diferentes (Risgaard, 1981 *apud* Borowitzka & Borowitzka, 1988). Provavelmente *D. tertiolecta* também variou de tamanho durante a execução do nosso trabalho. Outros autores relataram alteração de volume celular em *D. tertiolecta* com apenas 1 h de exposição ao cobre, provavelmente devido à alteração da permeabilidade da membrana celular a pequenos cátions, causada por exposição a metais pesados (Abalde *et al.*, 1995). As condições adequadas de luz em testes de toxicidade com algas são imprescindíveis para o sucesso do teste, já tendo sido relatado por Cleuvers & Ratte (2002) diferentes resultados em diferentes condições de luz. Estes autores sugeriram o aumento da intensidade luminosa para os testes de inibição do crescimento para $120 \mu\text{Es}^{-1}\text{m}^{-2}$.

Variações no protocolo do ensaio cometa podem levar resultados muito diferentes. Collins *et al.* (1995) observaram que quebras de fita visualizadas pelo ensaio cometa podem ser facilmente introduzidas em linfócitos por um pequeno aumento na velocidade de centrifugação. Banáth *et al.* (2001) verificaram a influência do pH, da temperatura e do tempo de lise na detecção de danos no ensaio cometa e chegaram à conclusão de que a condição que garante maior eficiência e reprodutibilidade é a lise com $\text{pH} > 13$ (comparada à lise com $\text{pH} 12,3$), realizado a 4°C (comparado à 22°C) e por tempo superior a 4 h. Esses autores observaram que quando a lise é conduzida à temperatura de 22°C , o aumento na duração da lise leva a um aumento de danos no DNA. Por outro lado, se conduzida a 4°C , lises de até 50 h de duração apresentavam os mesmos níveis de danos no DNA de células imersas nesta solução por somente 1 h, sugerindo, portanto, a existência de sítios *heat-labile*. Esses sítios já foram descritos por

Rydberg (2000) e provavelmente representam um tipo de dano no açúcar do DNA irradiado. Speit *et al.* (1999) testaram tempo de relaxamento de 20 e 40 min. e tempo de corrida de 20, 30 e 40 min., verificando que ambos influenciavam no momento de cauda. A separação das fitas de DNA ocorre em meio alcalino devido à destruição das pontes de hidrogênio entre as duas fitas. A taxa de relaxamento é dependente do comprimento das fitas de DNA, sendo que as quebras agem como pontos de início para a separação (Ahnstrom & Erixon, 1973 *apud* Mitchelmore & Chipman, 1998). Assim, quanto mais tempo o nucleóide é submetido ao relaxamento, maior é a separação das fitas. Speit *et al.* (1999) testaram também o efeito da temperatura no relaxamento e na corrida, e verificaram que a 20°C os danos no DNA são muito maiores que a 4°C, resultando em maior sensibilidade, porém, com maior variabilidade entre os experimentos. Os autores recomendam fortemente que o ensaio seja realizado em condições extremamente controladas para evitar artefatos que levem ao descrédito do mesmo. Assim, é possível que nossos dados tenham tido influência da condição das culturas e da variação da metodologia do cometa, de forma que o padrão observado de danos no DNA de *D. tertiolecta* tenha sido totalmente distinto do esperado segundo dados do experimento 1.

5.2.3. Correlação entre ID e parâmetros obtidos pelo *software* de análise de imagens

A exclusão dos dados das lâminas com excesso de *ghosts* (obtidos nas exposições a 0,5 e 1 μ M de 4NQO, as maiores concentrações testadas no ensaio cometa) fez com que o R^2 das regressões de momento de cauda, comprimento de cauda e porcentagem de DNA na cauda *versus* ID ficassem maiores que 0,75, indicando boa correlação em todos os casos (fig. 30, B-1 a B-3). Estes dados foram excluídos devido à ineficiência do *software* em analisar cometas com danos máximos que aparecem como *ghosts*, conforme discussão apresentada no item 5.2.1, e o aumento do R^2 após esta exclusão confirmam esta ineficiência.

Se considerarmos os dados na sua totalidade (sem a exclusão relatada acima), pode-se observar que a regressão de porcentagem de DNA na cauda *versus* ID é o que obtém o maior R^2 ($R^2 = 0,62$) (fig. 30, A-3). Collins *et al.* (1995) e Kammann *et al.* (2000) também obtiveram boa correlação do ID com a porcentagem de DNA na cauda do cometa. Por outro lado, após ajuste com exclusão dos dados das exposições às duas maiores concentrações de 4NQO, observa-se que a regressão de comprimento da cauda

versus ID é o que obteve maior R^2 ($R^2 = 0,86$) (fig. 30, B-2). Não foram encontrados trabalhos em que tivessem sido feitas regressões de comprimento de cauda ou momento de cauda *versus* ID, mas nossos dados indicam que os 3 parâmetros gerados pelo *software* de análise de imagens são igualmente bem correlacionados com o ID.

5.3.Exposição ao BAP

As concentrações usadas de BAP não afetaram a frequência das células móveis em nenhuma das condições testadas (tabela VII). Aoyama *et al.* (2003) verificaram a viabilidade de células de *Euglena gracilis* expostas a concentrações crescentes de BAP por 2 h no escuro e verificaram que a partir da concentração de 10 μ M (foram testadas concentrações até 100 μ M de BAP), a porcentagem de células viáveis passa a ser menor que 90%. Nas exposições de 2 h, nossos dados estão de acordo com os apresentados por Aoyama *et al.*, uma vez que não foram testadas concentrações maiores que 10 μ M. Porém, baseado nos resultados com *E. gracilis*, se considerarmos que os efeitos na viabilidade celular são dose-tempo dependentes (como no caso das exposições a H_2O_2 e 4NQO dos nossos experimentos; fig. 17 e 19), o resultado esperado seria de que na exposição de *D. tertiolecta* a 10 μ M de BAP por 4 h houvesse uma diminuição da mobilidade das células. Não só *D. tertiolecta* não apresenta diminuição da viabilidade para um valor abaixo de 90% como também apresenta uma altíssima viabilidade de mais de 98% de suas células. Estes dados sugerem que em termos de viabilidade, no escuro, *D. tertiolecta* é mais resistente à exposição de BAP que *E. gracilis*.

De todas as condições testadas de exposição a BAP, não houve nenhuma em que a exposição resultou em cometas com momento de cauda significativamente maiores do que os do solvente (fig. 31). Os dados de ID (tabela VIII) e de número de células encontradas em cada classe de dano (figs. 32) são coerentes com o padrão de danos descrito pela análise de momento de cauda.

Em relação ao solvente utilizado, observa-se que nas exposições por 4 h, o momento de cauda dos cometas do solvente são significativamente mais altos que o dos cometas do controle. Se considerarmos também as exposições por 4 h ao DMSO do experimento 2 de exposição a 4NQO (fig. 26, V-4h e VI-4h), constata-se que este aumento de danos no DNA de células expostas ao solvente ocorre somente no experimento de exposição a BAP, não ocorrendo nos experimentos de exposição a

4NQO. Este aumento de danos pode ser resultante de uma possível genotoxicidade do DMSO em exposições de 4 h (não ocorrendo em exposições mais curtas, de 1 e 2 h). Se for este o caso, é necessário que experimentos futuros com tempo de exposição igual ou maior que 4 h usem concentrações mais baixas de DMSO. Porém, já que o procedimento experimental foi o mesmo do realizado para o experimento 2 de exposição a 4NQO, é possível também que este aumento de danos tenha ocorrido ao acaso devido às mudanças nos procedimentos, conforme discutido no item 5.2.2.

Uma das possíveis explicações para a ausência de genotoxicidade de BAP em *D. tertiolecta* dos nossos experimentos é a capacidade desta microalga de metabolizar o BAP. Embora existam múltiplos mecanismos que contribuam para a carcinogenicidade, aterogenicidade e teratogenicidade do BAP, está cada vez mais aparente que são os seus metabólitos oxidativos os principais fatores responsáveis pelos efeitos deletérios na saúde. O BAP é oxidado a intermediários reativos e espécies radicais que comprometem o funcionamento das células. Dentre esses metabólitos, os metabólitos de hydroxi, epoxídeos, e quinonas são os mais reativos, e podem entrar um processo metabólico posterior para gerar espécies reativas de oxigênio (ERO). Alguns desses metabólitos (BPDE, um diol) podem exercer efeito carcinogênico pela formação de adutos de DNA (Miller & Ramos, 2001). Vários fatores interferem na biotransformação e na toxicidade dos xenobióticos, e entre eles, a espécie. A resposta tóxica varia significativamente entre as espécies, devendo ser levada em consideração quando se avalia a toxicidade de um composto para humanos, animais ou ambiente (Nascimento, 2006). Não foram encontrados trabalhos relatando a capacidade de *D. tertiolecta* metabolizar o BAP em compostos tóxicos. Nos poucos trabalhos encontrados de metabolização de BAP por algas, observa-se que a capacidade das algas de metabolizarem esta substância é bastante heterogênea. Warshawsky *et al.* (1995) verificaram que em exposições a 0,64 µM, de BAP sob luz amarela, *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Scenedesmus acutus* e *Ankistrodesmus braunii* (todas algas verdes) foram capazes de metabolizar o BAP completamente em dihidrodióis, enquanto que *Chlamydomonas reinhardtii* (também alga verde) não metabolizou BAP em nenhum grau. Por outro lado, *Ochromonas malhanensis* (alga amarela-verde), *Euglena gracilis* (euglenóide) e *Anabaena flos-aquae* (cianobactéria) metabolizaram BAP a dihidrodióis em graus menores que as 3 primeiras algas verdes.

Uma outra possível explicação para a ausência de genotoxicidade de BAP em *D. tertiolecta* poderia ser o tempo de exposição. Em células de hepatoma humano, é

necessário o tempo de 20 h para que o BAP seja ativado metabolicamente e exerça sua genotoxicidade (Uhl *et al.*, 1999). Segundo Gentile *et al.* (1990), foi necessário expor *Pseudokirchneriella subcapitata* por 48 h ao BAP para que este fosse ativado metabolicamente. Neste caso, mesmo que *D. tertiolecta* tivesse capacidade de metabolizar o BAP, é possível que nas curtas exposições realizadas (máximo de 4 h) as algas não tenham tido tempo para metabolizá-lo.

É também possível que a concentração de BAP e o tempo de exposição utilizados não tenham sido suficientes para induzir danos no DNA que fossem maiores que a capacidade de reparo de *D. tertiolecta*.

No nosso trabalho, todas as exposições aos contaminantes foram feitas no escuro, porém cabe destacar a alteração da toxicidade de determinadas substâncias quando há interação com a luz visível e ultra-violeta. É a chamada toxicidade foto-induzida dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), em que a toxicidade do HPA é aumentada quando há exposição à radiação ultra-violeta. No caso de algas, este fenômeno merece atenção especial devido à necessidade das algas se posicionarem na zona eufótica para a realização da fotossíntese. Este fenômeno já foi descrito em microalgas da espécie *Pseudokirchneriella subcapitata* expostas ao antraceno (Gala & Giesy, 1992), e em *P. subcapitata*, *Scenedesmus acutus* e *Ankistrodesmus braunii* expostas ao BAP (Cody *et al.*, 1984). A inibição do crescimento ocorre mais acentuadamente em incubações sob luz negra, sendo mais amena em incubações sob luz branca, e ausente em incubações sob luz fluorescente amarela. Na luz branca, a toxicidade foto-induzida ocorre devido à emissão de radiação na região próxima ao UV.

A presença da luz nestes testes é importante não só para os estudos de fotooxidação, mas também porque em organismos autotróficos como microalgas, a sua presença (amarela, no caso de compostos fotooxidáveis) pode auxiliar na forma como os compostos agem na célula prevenindo contra maiores danos, podendo também influenciar na capacidade de reparo (Erbes *et al.*, 1997; Hayashi *et al.*, 2004).

A escolha das concentrações de BAP utilizadas nos nossos experimentos foi baseada no trabalho de Aoyama *et al.* (2003), que encontraram danos significativamente mais altos em *E. gracilis* expostas a 5 μ M de BAP por 2 h no escuro. Apesar disso, não foram encontrados danos significativos no DNA de *D. tertiolecta* expostos a BAP em nenhuma das condições testadas (máximo de 10 μ M de BAP por 4 h). Desta forma, torna-se necessário realizar um teste de citotoxicidade para determinar as concentrações letais e sub-letais de BAP em *D. tertiolecta*. Uma vez confirmada a citotoxicidade, será

possível planejar experimentos com tempos de exposição e concentrações de BAP adequados para indução de danos no DNA para ensaio cometa. O uso de concentrações menores de DMSO ou de outros tipos de solventes também deve ser considerado.

5.4. Microalgas como organismos teste no ensaio cometa

Considerando a cepa CF-1 de *D. tertiolecta*, pode-se dizer que esta é uma cepa útil nos testes de genotoxicidade, desde que um rígido protocolo experimental do ensaio cometa seja seguido. Esta cepa poderia ser utilizada com sucesso em bioensaios com amostras coletadas do ambiente, e exposições de curta duração a concentrações crescentes das amostras poderiam indicar presença de compostos químicos genotóxicos na água. Entretanto, como foi possível observar pelos nossos resultados de exposição ao BAP, nem todos os compostos químicos poderiam ser identificados através deste ensaio, e portanto mais experimentos com outras substâncias, outros tempos de exposição (para o caso de haver necessidade de mais tempo para metabolização dos compostos), e outras concentrações de contaminantes são necessários antes que *D. tertiolecta* possa ser usada com sucesso em testes de toxicidade de amostras ambientais.

No caso de *D. tertiolecta* coletadas diretamente do ambiente, não é possível afirmar se as algas coletadas teriam a mesma resposta que a cepa CF-1 no ensaio cometa.

Alguns autores afirmam que o ensaio cometa poderia ser usado em amostras de campo em algumas circunstâncias (Sastre *et al.*, 2001). Nas situações mais comuns em que uma comunidade fitoplânctônica é observada, provavelmente será difícil diferenciar os danos entre espécies ou entre grupos taxonômicos. Porém, estes autores sugerem que em casos em que a composição do fitoplâncton é dominada por uma ou por poucas espécies, como em florações de fitoplâncton, o ensaio cometa poderia ser usado com sucesso. *Dunaliella* é um gênero com ampla distribuição, porém é um componente normalmente minoritário do fitoplâncton marinho principalmente devido à predação, sendo abundante somente em ambientes de condições extremas como alta temperatura, salinidade ou pH (Borowitzka & Borowitzka, 1988). *D. tertiolecta* não consegue competir com outras espécies de algas em culturas mistas em temperaturas abaixo de 30°C. Somente acima desta temperatura ela consegue competir com algas como diatomáceas *Phaeodactylum tricornutum* e *Thalassiosira pseudonana* (Goldman &

Ryther, 1976 *apud* Borowitzka & Borowitzka, 1988). Por outro lado, em exposições a DDT e a PCBs, Mosser *et al.* (1972) verificaram que *D. tertiolecta* consegue competir com *T. pseudonana*, diminuindo significativamente o número desta segunda espécie de microalga no meio de cultura. Não foram encontrados trabalhos que indiquem a dominância de *D. tertiolecta* em ambientes poluídos.

Em campo, alguns autores demonstraram claramente que o ensaio cometa pode detectar a redução da qualidade da água causada por poluição química (Frenzilli *et al.*, 2001). Devido aos aspectos do ensaio cometa já apresentados anteriormente, há a necessidade do cumprimento de um protocolo rígido para que os dados tenham reprodutibilidade. No caso de amostras ambientais, a quantidade de fatores não controlados aumenta. Além disso, níveis significativos de variação interindividual, incluindo variações sazonais de resposta, foram reportados em alguns estudos, tanto em laboratório quanto em campo (Nacci *et al.* 1996; Shaw *et al.*, 2000). Nosso trabalho indica a dificuldade em utilizar *D. tertiolecta* coletadas do ambiente devido à heterogeneidade das respostas de culturas aparentemente não sincronizadas.

6. CONCLUSÕES

- *D. tertiolecta* é uma espécie de alga adequada para ser utilizada como organismo teste no ensaio cometa.
- Cryptophyceae, *T. gracilis* e *Tetraselmis* sp. são algas potencialmente utilizáveis no ensaio cometa pelo critério de lise celular.
- A solução de lise alcalina iônica (SLAI) é mais eficiente do que a solução de lise salina aniônica (SLSA) para *D. tertiolecta* e Cryptophyceae. Estas algas foram lisadas em todas as condições testadas com estas soluções.
- *T. gracilis* e *Tetraselmis* sp. são parcialmente lisadas com SLAI em todas as condições testadas.
- A exposição a 0,5 mM H₂O₂ por 1 hora é adequada para indução de danos no DNA de *D. tertiolecta*.
- A viabilidade de *D. tertiolecta* não é afetada pela exposição a 0,5 mM de H₂O₂ por até 2 horas. Em 4 horas de exposição, a viabilidade não é afetada pela concentração de até 0,25 mM de H₂O₂.
- A viabilidade de *D. tertiolecta* não é afetada pela exposição a 1 µM de 4NQO por até 2 horas.
- A exposição a 0,25 µM de 4NQO por 1 hora é adequada para indução de danos no DNA de *D. tertiolecta*.
- As exposições de 1 h a 4NQO resultam em dados mais homogêneos entre réplicas quando comparadas às exposições de 2 e 4 h.
- Exposições a concentrações menores ou iguais a 10 µM de BAP por tempos menores ou iguais a 2 horas não resultam em danos significativos no DNA de *D. tertiolecta*.
- A exposição por 4 horas a concentrações de 0,4 e 10 µM de BAP resultou em danos significativamente maiores em relação a controle-água no DNA de *D. tertiolecta*. Esta exposição resultou também em danos significativos no DNA de *D. tertiolecta* do solvente em relação ao do controle-água.
- É necessário um estudo mais detalhado sobre os efeitos do BAP no DNA de *D. tertiolecta*, levando em consideração a concentração da substância e o tempo de exposição.

- É necessário também considerar a utilização de menores concentrações de DMSO em exposições de mais de 2 h de duração e outros tipos de solventes em experimentos futuros.
- O índice de danos é um bom índice para análise visual de cometas de microalgas. Este índice tem boa correlação com comprimento da cauda, porcentagem de DNA na cauda e momento de cauda, dados gerados pelo *software* de análise de imagem.
- A coloração com prata é tão eficiente quanto a coloração com brometo de etídio para analisar danos no DNA de microalgas no *software* de análise de imagem. A correlação entre dados de cometas corados com prata e cometas corados com brometo de etídio ainda não foi determinada.
- A resposta de uma população de células ao contaminante é heterogênea, sendo possível encontrar cometas de quase todas as classes em uma mesma lâmina em todos os experimentos.
- Mesmo com exposições feitas no escuro, as condições de luminosidade em que as microalgas foram cultivadas foram fatores decisivos no uso de estas no ensaio cometa.
- Os resultados obtidos demonstram a possibilidade da utilização de *D. tertiolecta* em laboratório para avaliação de genotoxicidade na água através do ensaio cometa.

7. BIBLIOGRAFIA

- Abalde, J.; Cid, A.; Reiriz, S.; Torres, E. & Herrero, C. 1995. Response of the Marine Microalga *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae) to Copper Toxicity in Short Time Experiments. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 54: 317-324.
- Adhiya, J.; Cai, X.; Sayre, R. T. & Traina, S. J. 2002. Binding of aqueous cadmium by the lyophilized biomass of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Colloids Surf., A Physicochem. Eng. Asp.*, 210: 1–11.
- Akcha, F.; Hubert, F. V. & Pfohl-Leszkowicz, A. 2003. Potential value of the comet assay and DNA adduct measurement in dab (*Limanda limanda*) for assessment of in situ exposure to genotoxic compounds. *Mutat. Res.*, 534: 21–32.
- Andersen, M. E. 1991. Quantitative risk assessment and chemical carcinogens in occupational environments. In: Lewis, R. J. (ed.) *Carcinogenically active chemicals: a reference guide*. New York, Van Nostrand Reinhold. p. 17-28.
- Anderson, D.; Yu, T.-W. & McGregor, D. B. 1998. Comet assay responses as indicators of carcinogen exposure. *Mutagenesis*, 13: 539-555.
- Andrade, V. M.; de Freitas, T. R. O.; da Silva, J. 2004. Comet assay using mullet (*Mugil* sp.) and sea catfish (*Netuma* sp.) erythrocytes for the detection of genotoxic pollutants in aquatic environment. *Mutat. Res.*, 560: 57–67.
- Aoyama, K.; Iwahori, K. & Miyata, N. 2003. Application of *Euglena gracilis* cells to comet assay: evaluation of DNA damage and repair. *Mutat. Res.*, 538: 155-162.
- Aragão, M. A. & Araújo, R. P. A. 2006. Métodos de Ensaio de Toxicidade com Organismos Aquáticos. In: Zagatto, P. A. & Bertoletti, E. (ed.) *Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações*. São Carlos, Editora Rima. p. 117-152.
- Bailleul, B.; Daubersies, P.; Galiègue-Zouitina, S. & Loucheux-Lefebvre, M. 1989. Molecular Basis of 4-Nitroquinoline 1-Oxide Carcinogenesis. *Jpn. J. Cancer Res.*, 80: 691-697.
- Banáth, J. P.; Kim, A. & Olive, P. L. 2001. Overnight Lysis Improves the Efficiency of Detection of DNA Damage in the Alkaline Comet Assay. *Radiat. Res.*, 155: 564–571.
- Bednarek, I.; Sypniewski, D.; Klama-Baryła, A.; Galka, S. & Machnik, G. 2006. Single-cell gel electrophoresis (comet assay) as a tool for apoptosis determination in

- tumor cell lines HL-60 and Jurkat cultures treated with anisomycin. *Ann. Acad. Med. Siles.*, 60: 278-284.
- Berges, J. A. & Falkowski, P. G. 1998. Physiological Stress and Cell Death in Marine Phytoplankton: Induction of Proteases in Response to Nitrogen or Light Limitation. *Limnol. Oceanogr.*, 43: 129-135.
- Bickham, J. W.; Sandhu, S.; Hebert, P. D. N.; Chikhi, L. & Athwal, R. 2000. Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations: implications for biomonitoring and ecotoxicology. *Mutat. Res.*, 463: 33–51.
- Birošová, L.; Mikulášová, M. & Chromá, M. 2005. The effect of phenolic and polyphenolic compounds on the development of drug resistance. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.*, 149: 405–7.
- Boeck, M. De & Kirsch-Volders, M. 1997. *Nereis virens* (Annelida: Polychaeta) Is Not an Adequate Sentinel Species To Assess the Genotoxic Risk (Comet Assay) of PAH Exposure to the Environment. *Environ. Mol. Mutagen.*, 30: 82-90.
- Bopp, S. K. & Lettieri, T. 2007. Gene regulation in the marine diatom *Thalassiosira pseudonana* upon exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Gene*, *in press*.
- Borowitzka, M. & Borowitzka, L. 1988. *Dunaliella*. In: Borowitzka, M. & Borowitzka, L. (ed.) *Micro-algal Biotechnology*. Cambridge, Cambridge University Press, p. 27-58.
- Boysen, G. & Hecht, S. S. 2003. Analysis of DNA and protein adducts of benzo[a]pyrene in human tissues using structure-specific methods. *Mutat. Res.*, 543: 17–30.
- Cerda, H.; H. Delincé; H. Haine & H. Rupp. 1997. The DNA “comet assay” as a rapid screening technique to control irradiated food. *Mutat. Res.*, 375: 167-181.
- Cheung, Y. H.; A. Neller; K. H. Chu; N. F.Y. Tam; C. K. Wong; Y. S. Wong & M. H. Wong. 1997. Assessment of Sediment Toxicity Using Different Trophic Organisms. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 32: 260–267.
- Ciniglia, C.; Cascone, C.; Lo Giudice, R.; Pinto, G. & Pollio, A. 2005. Application of methods for assessing the geno- and cytotoxicity of Triclosan to *C. ehrenbergii*. *J. Hazard. Mater.*, 122: 227–232.
- Cleuvers, M. & Ratte, H. T. 2002. The importance of light intensity in algal tests with coloured substances. *Water Res.*, 36: 2173–2178.

- Cody, T. E.; Radike, M. J. & Warshawsky, D. 1984. The Phototoxicity of Benzo[a]pyrene in the Green Alga *Selenastrum capricornutum*. Environ. Res., 35: 122-132.
- Collins, A. R.; Ai-guo, M. & Duthie, S. J. 1995. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. Mutat. Res., 336: 69-77.
- Collins, A. R. 2004. The Comet Assay for DNA Damage and Repair: Principles, Applications, and Limitations. Mol. Biotech., 26: 249-261.
- Desai, S. R.; Verlecar, X. N.; Nagarajappa & Goswami, U. 2006. Genotoxicity of cadmium in marine diatom *Chaetoceros tenuissimus* using the alkaline Comet assay. Ecotoxicology, 15: 359–363.
- Di Paolo, C. 2006. Aplicação do Ensaio Cometa a estudo de danos ao DNA de robalos, *Centropomus parallelus* (Poey, 1860), expostos à β -naftoflavona. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, Instituto Oceanográfico, 91 p.
- Diekmann, M.; Waldmann, P.; Schnurstein, A.; Grummt, T.; Braunbeck, T. & Nagel, R. 2004. On the relevance of genotoxicity for fish populations II: genotoxic effects in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to 4-nitroquinoline-1-oxide in a complete life-cycle test. Aquat. Toxicol., 68: 27–37.
- Dixon, D. R.; Pruski, A. M.; Dixon, L. R. J. & Jha, A. N. 2002. Marine invertebrate eco-genotoxicology: a methodological overview. Mutagenesis, 17: 495–507.
- Djomo, J. E.; Dauta, A.; Ferrier, V.; Narbonne, J. F.; Monkiedje, A.; Njine, T. & Garrigues, P. 2004. Toxic effects of some major polyaromatic hydrocarbons found in crude oil and aquatic sediments on *Scenedesmus subspicatus*. Water Res., 38: 1817–1821.
- Dodge, J. D. 1973. The Fine Structure of Algal Cells. London, Academic Press. 261p.
- Eisentraeger, A.; Dott, W.; Klein, J. & Hahn, S. 2003. Comparative studies on algal toxicity testing using fluorometric microplate and Erlenmeyer flask growth-inhibition assays. Ecotoxicol. Environ. Saf., 54: 346–354.
- Endo, H.; Wada, A.; Miura, K.; Hidaka, Z. & Hiruki, C. 1961. Mutation in Tobacco Mosaic Virus induced by a New Carcinogen, 4-Nitroquinoline N-Oxide. Nature, 190: 833-834.
- Erbes, M.; Weßler, A.; Obst, U. & Wild, A. 1997. Detection of Primary DNA Damage in *Chlamydomonas reinhardtii* by Means of Modified Microgel Electrophoresis. Environ. Mol. Mutag., 30: 448–458.

- Fabregas, J.; Herrero, C.; Abalde, J.; Liaño, R. & Cabezas, B. 1986. Biomass production and biochemical variability of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* (Butcher) with high nutrient concentrations. *Aquaculture*, 53: 187-199.
- Fairbairn, D. W.; Olive, P. L. & O'Neill, K. L. 1995. The comet assay: a comprehensive review. *Mutat. Res.*, 339: 37-59.
- Foltinová, P. & Grönes, J. 1997. *Euglena gracilis* as an eukaryotic test organism for detecting mutagens and antimutagens. *Mutat. Res.*, 393: 1-6.
- Frenzilli, G.; Nigro, M.; Scarcelli, V.; Gorbi, S. & Regoli, F. 2001. DNA integrity and total oxyradical scavenging capacity in the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*: a field study in a highly eutrophicated coastal lagoon. *Aquat. Toxicol.*, 53: 19-32.
- Gala, W. R. & Giesy, J. P. 1992. Photo-Induced Toxicity of Anthracene to the Green Alga, *Selenastrum capricornutum*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 23: 316-323.
- García, O.; Mandina, T.; Lamadrid, A. I.; Diaz, A.; Remigio, A.; Gonzalez, Y.; Piloto, J.; Gonzalez, J. E. & Alvarez, A. 2004. Sensitivity and variability of visual scoring in the comet assay: results of an inter-laboratory scoring exercise with the use of silver staining. *Mutat. Res.*, 556: 25-34.
- Gedik, C. M.; Ewen, S. W. B. & Collins, A. R. 1992. Single-cell gel electrophoresis applied to the analysis of UV-C damage and its repair in human cells. *Int. J. Radiat. Biol.*, 62: 313-320.
- Gentile, J. M.; Lippert, M.; Johnson, P. & Shafer, T. 1990. Activation of Chemical Promutagens by *Selenastrum capricornutum* in the Plant Cell/Microbe Coincubation Assay. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 44: 729-736.
- Gichner, T.; Mukherjee, A. & Velemínský, J. 2006. DNA staining with the fluorochromes EtBr, DAPI and YOYO-1 in the comet assay with tobacco plants after treatment with ethyl methanesulphonate, hyperthermia and DNase-I. *Mutat. Res.*, 605: 17-21.
- Guillard, R. R. L. 1973. Division Rates. In: Stein, J. R. (ed.) *Handbook of Phycological Methods: Culture Methods & Growth Measurements*. New York, Cambridge University Press. 448p.
- Gontijo, A. M. M. C.; Elias, F. N.; Salvadori, D. M. F.; Oliveira, M. L. C. S.; Correa, L. A.; Goldberg, J.; Trindade, J. C. S. & Camargo, J. L. V. 2001. Single-Cell Gel

- (Comet) Assay Detects Primary DNA Damage in Nonneoplastic Urothelial Cells of Smokers and Ex-smokers. *Cancer Epidemiol. Biomarkers. Prev.*, 10: 987-993.
- Gontijo, A. M. M. C. & Tice, R. 2003. Teste do cometa para detecção de dano do DNA e reparo em células individualizadas. In: Ribeiro, L. R.; Salvadori, D. M. F. & Marques, E. K. (ed.) *Mutagênese Ambiental*. Canoas, Editora da ULBRA. p. 247-279.
- Gossiaux, D. C.; Landrum, P. F. & Fished, S. W. 1998. The Assimilation of Contaminants from Suspended Sediment and Algae by the Zebra Mussel, *Dreissena polymorpha*. *Chemosphere*, 36: 3181-3197.
- Gottlieb, M. & Chavko, M. 1987. Silver Staining of Native and Denatured Eucaryotic DNA in Agarose Gels. *Anal. Biochem.*, 165: 33-37.
- Hall, J. A. & Golding, L. A. 1998. Marine algae (*Dunaliella tertilecta*): Chronic Toxicity Test Protocol. Appendix to: Standard methods for whole effluent toxicity testing: development and application. Report no. MFE80205. NIWA report for the Ministry for the Environment, Wellington, New Zealand. p. 1-30.
- Hartl, M. G. J.; Coughlan, B. M.; Sheehan, D.; Mothersill, C.; Van Pelt, F. N. A. M.; O'Reilly, S. J.; Heffron, J. J. A.; O'Halloran, J. & O'Brien, N. M. 2004. Implications of seasonal priming and reproductive activity on the interpretation of Comet assay data derived from the clam, *Tapes semidecussatus* Reeves 1864, exposed to contaminated sediments. *Mar. Environ. Res.*, 57: 295-310.
- Harwood, M.; Blaise, C. & Couture, P. 1989. Algal interactions with the genotoxic activity of selected chemicals and complex liquid samples. *Aquat. Toxicol.*, 14: 263-276.
- Havaux, M. 1998. Carotenoids as membrane stabilizers in chloroplasts. *Trends Plant Sci.*, 3: 147-151.
- Hayashi, H.; Narumi, I.; Wada, S.; Kikuchi, M.; Furuta, M.; Uehara, K. & Watanabe, H. 2004. Light dependency of resistance to ionizing radiation in *Euglena gracilis*. *J. Plant Physiol.*, 161: 1101-1106.
- Henriques, N. M.; Navalho, J. C.; Varela, J. C. & Cancela, M. L. 1998. *Dunaliella*: uma fonte natural de beta-caroteno com potencialidades de aproveitamento biotecnológico. *Bol. Biotecnol.*, 61: 12-18.
- Héron-Milhavet, L.; Karas, M.; Goldsmith, C. M.; Baum, B. J. & LeRoith, D. 2001. Insulin-like Growth Factor-I (IGF-I) Receptor Activation Rescues UV-

- damaged Cells through a p38 Signaling Pathway: Potential Role of the IGF-I Receptor in DNA Repair. *J. Biol. Chem.*, 276: 18185–18192.
- Holm-Hansen, O. 1969. Algae: Amounts of DNA and Organic Carbon in Single Cells. *Science*, 163: 87-88.
- Hömme, M.; Jacobi, H.; Juhl-Strauss, U. & Witte, I. 2000. Synergistic DNA damaging effects of 4-nitroquinoline-1-oxide and non-effective concentrations of methyl methanesulfonate in human fibroblasts. *Mutat. Res.*, 461: 211–219.
- Hook, S. E. & Lee, R. F. 2004. Interactive effects of UV, benzo[a] pyrene, and cadmium on DNA damage and repair in embryos of the grass shrimp *Palaemonetes pugio*. *Mar. Environ. Res.*, 58: 735–739.
- Husseini, G. A.; O'Neill, K. L. & Pitt, W. G. 2005. The Comet Assay to Determine the Mode of Cell Death for the Ultrasonic Delivery of Doxorubicin to Human Leukemia (HL-60 Cells) from Pluronic P105 Micelles. *Technol. Cancer Res. Treat.*, 4: 707-711.
- Johnson, I.; Hutchings, M.; Benstead, R.; Thain, J. & Whitehouse, P. 2004. Bioassay Selection, Experimental Design and Quality Control/Assurance for use in Effluent Assessment and Control. *Ecotoxicology*, 13: 437–447.
- Juhasz, A. L. & Naidu, R. 2000. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 45: 57-88.
- Kamer, I. & Rinkevich, B. 2002. *In vitro* application of the comet assay for aquatic genotoxicity: considering a primary culture versus a cell line. *Toxicol. in Vitro*, 16: 177–184.
- Kammann, U.; Riggers, J. C.; Theobald, N. & Steinhart, H. 2000. Genotoxic potential of marine sediments from the North Sea. *Mutat. Res.*, 467: 161–168.
- Khan, A. A.; Khan, H. M. & Delincée, H. 2005. DNA Comet Assay—a rapid screening method for detection of irradiated cereals and tree nuts. *Food Control*, 16: 141–146.
- Kim, G. B. & Lee, R. F. 2004. Effects of genotoxic compounds on DNA and development of early and late grass shrimp embryo stages. *Mar. Environ. Res.*, 57: 329–338.
- Kirso, U. & Irha, N. 1998. Role of Algae in Fate of Carcinogenic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 41: 83-89.

- Lee, R. F. & Steinert, S. 2003. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutat. Res.*, 544: 43–64.
- Lemée, R.; Pesando, D.; Issanchou, C. & Amade, P. 1997. Microalgae: a Model to Investigate the Ecotoxicity of the Green Alga *Caulerpa taxifolia* from the Mediterranean Sea. *Mar. Environ. Res.*, 44: 13-25.
- Lemos, N. G.; Dias, A. L.; Silva-Souza, A. T. & Mantovani, M. S. 2005. Evaluation of environmental waters using the comet assay in *Tilapia rendalli*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 19: 197–201.
- Lewis, M. A. 1995. Algae and vascular plant tests. In: Rand, G. M. (ed.) *Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment*. 2a. ed. Washington, Taylor & Francis. p. 135-169.
- Lewis, R. J. 1991. *Carcinogenically active chemicals: a reference guide*. New York, Van Nostrand Reinhold. 1153 p.
- Lima, P. L. A. & Ribeiro, L. R. 2003. Teste de mutação gênica em células de mamífero (*mouse lymphoma assay*). In: Ribeiro, L. R.; Salvadori, D. M. F. & Marques, E. K. (ed.) *Mutagenese Ambiental*. Canoas, Editora da ULBRA. p. 113-149.
- Liu, W.; Yang, Y. S.; Li, P.; Zhou, Q. & Sun, T. 2004. Root growth inhibition and induction of DNA damage in soybean (*Glycine max*) by chlorobenzenes in contaminated soil. *Chemosphere*, 57: 101–106.
- Malkin, M. F. & Zahalsky, A. C. 1966. Interaction of the Water-Soluble Carcinogen 4-Nitroquinoline N-Oxide with DNA. *Science*, 154: 1665-1667.
- Matsushima, T.; Kobuna, I. & Sugimura, T. 1967. In vivo Interaction of 4-Nitroquinoline 1-Oxide and its Derivatives with DNA. *Nature*, 216: 508.
- Meintières, S.; Nessler, F.; Pallardy, M. & Marzin, D. 2003. Detection of Ghost Cells in the Standard Alkaline Comet Assay Is Not a Good Measure of Apoptosis. *Environ. Mol. Mutagen.*, 41: 260–269.
- Miller, K. P. & Ramos, K. S. 2001. Impact of cellular metabolism on the biological effects of benzo[a]pyrene and related hydrocarbons. *Drug Metab. Rev.*, 33: 1-35.
- Mitchellmore, C. L. & Chipman, J. K. 1998. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring *Mutat. Res.*, 399: 135–147.

- Mitchelmore, C. L. & Hyatt, S. 2004. Assessing DNA damage in cnidarians using the Comet assay. *Mar. Environ. Res.*, 58: 707–711.
- Miyamae, Y.; Iwasaki, K.; Kinae, N.; Tsuda, S.; Murakami, M.; Tanaka, M. & Sasaki, Y. F. 1997. Detection of DNA lesions induced by chemical mutagens by single cell gel electrophoresis (Comet) assay: relationship between DNA migration and alkaline conditions. *Mutat. Res.*, 393: 107-113.
- Mokady, S.; Abramovici, A. & Cogan, U. 1989. The safety evaluation of *Dunaliella bardawil* as a potential food supplement. *Fd. Chem. Toxic.*, 27: 221-226.
- Moreno-Garrido, I.; Lubián, L. M. & Soares, A. M. V. M. 2000. Influence of Cellular Density on Determination of EC50 in Microalgal Growth Inhibition Tests. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 47: 112-116.
- Morley, N.; Rapp, A.; Dittmar, H.; Salter, L.; Gould, D.; Greulich, K. O. & Curnow, A. 2006. UVA-induced apoptosis studied by the new apo/necro-Comet-assay which distinguishes viable, apoptotic and necrotic cells. *Mutagenesis*, 21: 105–114.
- Mosser, J. L.; Fisher, N. S. & Wurster, C. F. 1972. Polychlorinated Biphenyls and DDT Alter Species Composition in Mixed Cultures of Algae. *Science*, 176: 533-535.
- Nacci, D. E.; Cayula, S. & Jackim, E. 1996. Detection of DNA damage in individual cells from marine organisms using the single cell gel assay. *Aquat. Toxicol.*, 35: 197-210.
- Nadin, S. B.; Vargas-Roig, L. M. & Ciocca, D. R. 2001. A Silver Staining Method for Single-cell Gel Assay. *J. Histochem. Cytochem.*, 49: 1183–1186.
- Nagai, S. 1969. Production of respiration-deficient mutants in yeast by a carcinogen, 4-Nitroquinoline 1-Oxide. *Mutat. Res.*, 7: 333-337.
- Nagata, C.; Kodama, M.; Tagashira, Y. & Imamura, A. 1966. Interaction of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons, 4-Nitroquinoline 1-Oxides, and Various Dyes with DNA. *Biopolymers*, 4: 409-427.
- Nakahara W, Fukuoka F & Sugimura T 1957. Carcinogenic action of 4NQO. *Gann* 48:129-137.
- Nascimento, E. 2006. Mecanismos Bioquímicos dos Agentes Químicos: Biotransformação. In: Zagatto, P. A. & Bertoletti, E. (ed.) *Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações*. São Carlos, Editora Rima. p. 39-54.

- Navarrete, M. H.; Carrera, P.; Miguel, M. & Torre, C. 1997. A fast comet assay variant for solid tissue cells. The assessment of DNA damage in higher plants. *Mutat. Res.*, 389: 271–277.
- Pelczar, M.; Reid, R. & Chan, E. C. S. 1980. *Microbiologia*. vol. 1. São Paulo, Ed. McGraw-Hill Ltda. 566 p.
- O'Farrell, I.; Lombardo, R. J.; Pinto, P. de T. & Loez, C. 2002. The assessment of water quality in the Lower Luján River (Buenos Aires, Argentina): phytoplankton and algal bioassays *Environ. Pollut.*, 120: 207–218.
- Okabayashi, T.; Ide, M.; Yoshimoto, A. & Otsubo, M. 1965. Mutagenic Activity of 4-Nitroquinoline 1-Oxide and 4-Hydroxyaminoquinoline 1-Oxide on Bacteria. *Chem. Pharm. Bull.*, 13: 610-611.
- Okay, O. S.; Donkin, P.; Peters, L. D. & Livingstone, D. R. 2000. The role of algae (*Isochrysis galbana*) enrichment on the bioaccumulation of benzo[a]pyrene and its effects on the blue mussel *Mytilus edulis*. *Environ. Pollut.*, 110: 103-113.
- Okumura, Y.; Koyama, J.; Takaku, H. & Satoh, H. 2001. Influence of Organic Solvents on the Growth of Marine Microalgae. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 41: 123–128.
- Oliveira, E. M.; Suzuki, M. F.; Nascimento, P. A.; Silva, M. A. & Okazaki, K. 2001. Evaluation of the effect of ^{90}Sr β -radiation on human blood cells by chromosome aberration and single cell gel electrophoresis (comet assay) analysis. *Mutat. Res.*, 476: 109–121.
- Oren, A. 2005. A hundred years of *Dunaliella* research: 1905–2005. *Saline Syst.*, 1: 1-14.
- Parnell, P. E. 2003. The effects of sewage discharge on water quality and phytoplankton of Hawaiian coastal waters. *Mar. Environ. Res.*, 55: 293–311.
- Quigg, A.; Beardall, J. & Wydrzynski, T. 2003. Photoacclimation involves modulation of the photosynthetic oxygen-evolving reactions in *Dunaliella tertiolecta* and *Phaeodactylum tricornutum*. *Funct. Plant Biol.*, 30: 301-308.
- Rank, J. & Jensen, K. 2003. Comet assay on gill cells and haemocytes from the blue mussel *Mytilus edulis*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 54: 323–329.
- Ribeiro, D. A.; Salvadori, D. M. F.; Silva, R. N.; Darros, B. R. & Marques, M. E. A. 2004. Genomic instability in non-neoplastic oral mucosa cells can predict risk during 4-nitroquinoline 1-oxide-induced rat tongue carcinogenesis. *Oral Oncol.*, 40: 910–915.

- Rojas, E.; Lopez, M. C. & Valverde, M. 1999. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *J. Chromatogr. B*, 722: 225-254.
- Rydberg, B. 2000. Radiation-Induced Heat-Labile Sites that Convert into DNA Double-Strand Breaks. *Radiat. Res.*, 153: 805–812.
- Saçan, M. T. and Balcıoğlu, I. A. 2001. Bioaccumulation of Aluminium in *Dunaliella tertiolecta* in Natural Seawater: Aluminium–Metal (Cu, Pb, Se) Interactions and Influence of pH. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 66: 214–221.
- Sastre, M. P.; Vernet, M. & Steinert, S. 2001. Single-cell Gel/Comet Assay Applied to the Analysis of UV Radiation – induced DNA Damage in *Rhodomonas* sp. (Cryptophyta). *Photochem. Photobiol.*, 74: 55–60.
- Segovia, M.; Haramaty, L.; Berges, J. A. & Falkowski, P. G. 2003. Cell Death in the Unicellular Chlorophyte *Dunaliella tertiolecta*. A Hypothesis on the Evolution of Apoptosis in Higher Plants and Metazoans. *Plant Physiol.*, 132: 99–105.
- Shaw, J. P.; Large, A. T.; Chipman, J. K.; Livingstone, D. R. & Peters, L. D. 2000. Seasonal variation in mussel *Mytilus edulis* digestive gland cytochrome P4501A- and 2E-immunoidentified protein levels and DNA strand breaks (Comet assay). *Mar. Environ. Res.*, 50: 405-409.
- Silva, J.; Freitas, T. R.O.; Marinho, J. R.; Speit, G. & Erdtmann, B. 2000. An alkaline single-cell gel electrophoresis (comet) assay for environmental biomonitoring with native rodents. *Genet. Mol. Biol.*, 23: 241-245.
- Singer, V.; Lawlor, T. E. & Yue, S. 1999. Comparison of SYBR® Green I nucleic acid gel stain mutagenicity and ethidium bromide mutagenicity in the *Salmonella*/mammalian microsome reverse mutation assay (Ames test). *Mutat. Res.*, 439: 37–47.
- Singh, N. P.; McCoy, M. T.; Tice, R. R. & Schneider, E. L. 1988. A simple technique for quantitation of low level of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell. Res.*, 175: 184-191.
- Singh, N. P.; Stephens, R. E. & Schneider, E. L. 1994. Modifications of alkaline microgel electrophoresis for sensitive detection of DNA damage. *Int. J. Radiat. Biol.*, 66: 23–28.
- Sipaúba-Tavares, L. H. & Rocha, O. 2003. Produção de Plâncton (Fitoplâncton e Zooplâncton) para Alimentação de Organismos Aquáticos. São Carlos, Editora Rima. 106 p.

- Smayda, T. J.; E. L. Venrick; H. J. Semina & R. R. L. Guillard. 1978. Estimating cell numbers. In: Sournia, A. (ed.) *Phytoplankton manual*. United Kingdom, United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization. p. 175-189.
- Speit, G.; Trenz, K.; Schütz, P.; Rothfuß, A. & Merk, O. 1999. The influence of temperature during alkaline treatment and electrophoresis on results obtained with the comet assay. *Toxicol. Lett.*, 110: 73–78.
- Taban, I. C.; Bechmann, R. K.; Torggrimsen, S.; Baussant, T. & Sanni, S. 2004. Detection of DNA damage in mussels and sea urchins exposed to crude oil using comet assay. *Mar. Environ. Res.*, 58: 701–705.
- Taddei, F.; Scarcelli, V.; Frenzilli, G. & Nigro, M. 2001. Genotoxic Hazard of Pollutants in Cetaceans: DNA Damage and Repair Evaluated in the Bottlenose Dolphin (*Tursiops truncatus*) by the Comet Assay. *Mar. Pollut. Bull.*, 42: 324-328.
- Tice, R. R.. 1995. The single cell gel/comet assay: a microgel electrophoretic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells. In: Phillipos, D. H. & S. Venitt (eds). *Environmental Mutagenesis*. Oxford, BIOS Scientific Publishers. p. 315-339.
- Tice, R. R.; Agurell, E.; Anderson, D.; Burlinson, B.; Hartmann, A.; Kobayashi, H.; Miyamae, Y.; Rojas, E.; Ryu, J.-C. & Sasaki, Y. F. 2000. Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. *Environ. Mol. Mutagen.*, 35: 206-221.
- Tsuchihashi, H.; Kigoshi, M.; Iwatsuki, M. & Niki, E. 1995. Action of β -Carotene as an Antioxidant against Lipid Peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.*, 323: 137–147.
- Uhl, M.; Helma, C. & Knasmüller, S. 1999. Single-cell gel electrophoresis assays with human-derived hepatoma (Hep G2) cells. *Mutat. Res.*, 441: 215–224.
- Valentin-Severin, I.; Le Hegarat, L.; Lhuguenot, J. C.; Le Bona, A. M. & Chagnona, M. C. 2003. Use of HepG2 cell line for direct or indirect mutagens screening: comparative investigation between comet and micronucleus assays. *Mutat. Res.*, 536: 79–90.
- Vidotti, E. C. & Rollemberg, M. C. E. 2004. Algas: da economia nos ambientes aquáticos à bioremediação e à química analítica. *Quim. Nova*, 27: 139-145.

- Villela, I. V.; Oliveira, I. M.; Silva, J. & Henriques, J. A. P. 2006. DNA damage and repair in haemolymph cells of golden mussel (*Limnoperna fortunei*) exposed to environmental contaminants. *Mutat. Res.*, 605: 78–86.
- Visvardis, E. E.; Tassiou, A. M. & Piperakis, S. M. 1997. Study of DNA damage induction and repair capacity of fresh and cryopreserved lymphocytes exposed to H₂O₂ and γ -irradiation with the alkaline comet assay. *Mutat. Res.*, 383: 71–80.
- Wang, W. 1991. Literature Review on Higher Plants for Toxicity Testing. *Water Air Soil Pollut.*, 59: 381-400.
- Warshawsky, D.; Cody, T.; Radike, M.; Reilman, R.; Schumann, B.; LaDow, K. & Schneider, J. 1995. Biotransformation of benzo[a]pyrene and other polycyclic aromatic hydrocarbons and heterocyclic analogs by several green algae and other algal species under gold and white light. *Chem. Biol. Interactions*, 97: 131-148.
- Warshawsky, D.; Keenan, T. H.; Reilman, R.; Cody, T. E. & Radike, M. 1990. Conjugation of benzo[a]pyrene metabolites by freshwater green alga *Selenastrum capricornutum*. *Chem. Biol. Interactions*, 74: 93-105.
- Watanabe, M. & Suzuki, T. 2002. Involvement of reactive oxygen stress in cadmium-induced cellular damage in *Euglena gracilis*. *Comp. Biochem. Physiol. C*, 131: 491–500.
- Weyers, A. & Vollmer, G. 2000. Algal growth inhibition: effect of the choice of growth rate or biomass as endpoint on the classification and labelling of new substances notified in the EU. *Chemosphere*, 41: 1007-1010.
- Yokomizo, K.; Maruya, S.; Hiratsuka, N. & Shiba, K. 2006. A silver staining procedure for proteins in agarose gels. *J. Electrophoresis*, 50: 1-5.

8. ANEXO 1 – TABELAS

Tabela I - Resumo de testes de lise de oito espécies de algas em solução de lise alcalina iônica (SLAI) e solução de lise salina aniônica (SLSA).

	<i>C. minutissima</i>	Cryptophyceae	<i>D. tertiolecta</i>	<i>Hillea</i> sp.	<i>Ochromonas</i> sp.	<i>T. alacris</i>	<i>T. gracilis</i>	<i>Tetraselmis</i> sp.
Controle	x	x	x	x	x	x	x	x
SLAI - 5min.	x	lise	lise	x	x	x	lise parcial	lise parcial
SLAI - 15min.	x	lise	lise	x	x	x	lise parcial	lise parcial
SLAI - 30min.	x	lise	lise	x	x	x	lise parcial	lise parcial
SLAI - 1h	x	lise	lise	x	x	x	lise parcial	lise parcial
SLAI - 2h	x	lise	lise	x	x	x	lise parcial	lise parcial
SLSA - 1h	x	lise	lise	x	x	x	x	x
SLSA - 2h	x	lise	lise	x	x	x	x	x
SLSA - 4h	x	lise	lise	x	x	x	x	x

x: Condição em que as células não apresentam lise celular.

Nota-se que *D. tertiolecta* e Cryptophyceae são as algas que podem ser lisadas em todas as condições testadas.

Tabela II – Frequência de células móveis (%) após 1 h de exposição a 0,5 mM de H₂O₂ no escuro. Células usadas para o estabelecimento de voltagem para eletroforese.

controle	0,5 mM H ₂ O ₂
97,6	86,9
74,3	84,7
90,3	94,3
93,5	95,1
98,0	93,7
91,5	99,3

Tabela III - Frequência de células móveis (%) após 1 h de exposição a diferentes concentrações de 4NQO (μM) no escuro. I e II são réplicas.

exposição	% de células móveis	
	I	II
controle	89,8	97,1
solvente	88,3	99,1
0,25 μM	97,4	98,8
0,5 μM	94,3	99,2
1 μM	87,8	96,9

Tabela IV - Índices de dano de cometas de *D. tertiolecta* após exposição a diferentes concentrações de 4NQO por 1 h, analisados nas lâminas coradas com BrEt e prata. Resultados do Experimento 1.

exposição	BrEt		prata	
	I	II	I	II
controle	84	85	37	89
solvente	48	92	30	80
0,25 μM	193	200	285	202
0,5 μM	193	301	266	310
1 μM	276	385	400	398

Tabela V - Frequência de células móveis (%) após 1, 2 e 4 h de exposição a diferentes concentrações de 4NQO (nM) no escuro. Os pares I e II, III e IV, V e VI são réplicas.

exposição	% de células móveis					
	I-1h	II-1h	III-2h	IV-2h	V-4h	VI-4h
controle	95,1	97,8	99,1	97,8	99,1	100,0
solvente	98,0	98,4	99,3	99,3	97,7	99,2
4 nM	99,5	98,9	93,0	98,2	97,7	95,5
20 nM	97,1	98,9	98,7	95,5	96,4	99,3
100 nM	98,3	96,7	93,9	100,0	84,9	98,9

Tabela VI - Índice de dano de cometas de *D. tertiolecta* após exposição a diferentes concentrações de 4NQO por 1, 2 e 4 h. Resultados do Experimento 2. Coloração: BrEt.

exposição	I-1h	II-1h	III-2h	IV-2h	V-4h	VI-4h
controle	84	85	66	120	124	68
solvente	76	88	108	64	89	72
4 nM	151	174	137	142	136	136
20 nM	72	153	68	116	123	87
100 nM	95	108	104	123	111	98

Tabela VII - Frequência de células móveis (%) após 1, 2 e 4 h de exposição a diferentes concentrações de BAP (μ M) no escuro.

exposição	% de células móveis		
	1h	2h	4h
controle	98,1	96,9	100,0
solvente	99,1	97,8	100,0
0,4 μ M	98,5	98,3	98,4
2 μ M	95,2	98,0	99,1
10 μ M	96,3	98,4	98,4

Tabela VIII - Índice de dano de cometas de *D. tertiolecta* após exposição a diferentes concentrações de BAP por 1, 2 e 4 h. Coloração: BrEt.

exposição	1 h	2 h	4 h
controle	97	144	64
solvente	98	84	177
0,4 μ M	143	76	169
2 μ M	84	54	84
10 μ M	56	71	103

9. ANEXO 2 – FIGURAS

Figura 1 – *Dunaliella tertiolecta* cepa CF1. Barra = 10 μm .

Figura 2 – *D. tertiolecta* mantidas em meio de cultura Guillard “f/2” na incubadora do Banco de Microorganismos Marinhos do IOUSP.

Figura 3 - Teste de lise com *Chlorella minutissima*. 1 a 3: coradas com Giemsa. 4 a 6: coradas com Nitrato de Prata. 1: Controle, sem lise. 2: 2h de SLAI. 3: 4h de SLSA. 4: Controle, sem lise. 5: 2h de SLAI. 6: 4h de SLSA. As algas desta espécie não apresentaram lise celular em nenhuma das condições testadas. Além disso, o tamanho reduzido de *C. minutissima* dificulta o trabalho pois pode ser confundido com sujeira, comum na coloração com Nitrato de Prata (4,5,6). Barra = 10 μ m.

Figura 4 - Teste de lise com Cryptophyceae. 1 a 3: coradas com Giemsa. 4 a 6: coradas com Nitrato de Prata. 1: Controle, sem lise. 2: 5 min. na SLAI. 3: 1h na SLSA. 4: Controle, sem lise. 5: 5 min. na SLAI. 6: 1h na SLSA. As algas deste grupo apresentaram lise celular facilmente, com apenas 5min. na SLAI (fotos 2 e 5), e 1h na SLSA (fotos 3 e 6). Barra = 10 μ m.

Figura 5 - Teste de lise com *Dunaliella tertiolecta*. 1 a 3: coradas com Giemsa. 4 a 6: coradas com Nitrato de Prata. 1: Controle, sem lise. 2: 5 min. na SLAI. 3: 1h na SLSA. 4: Controle, sem lise. 5: 5 min. na SLAI. 6: 1h na SLSA. As algas desta espécie apresentaram lise celular facilmente, com apenas 5min. na SLAI (fotos 2 e 5) e 1h na SLSA (fotos 3 e 6). Barra = 10 μ m.

Figura 6 - Teste de lise com *Hillea* sp. 1 a 3: coradas com Giemsa. 4 a 6: coradas com Nitrato de Prata. 1: Controle, sem lise. 2: 2h na SLAI. 3: 4h na SLSA. 4: Controle, sem lise. 5: 2h na SLAI. 6: 4h na SLSA. As algas deste grupo não apresentaram lise celular em nenhuma das condições testadas. Barra = 10 μ m.

Figura 7 - Teste de lise com *Ochromonas* sp. 1 a 3: coradas com Giemsa. 4 a 6: coradas com Nitrato de Prata. 1: Controle, sem lise. 2: 2h na SLAI. 3: 4h na SLSA. 4: Controle, sem lise. 5: 2h na SLAI. 6: 4h na SLSA. As algas deste grupo não apresentaram lise celular em nenhuma das condições testadas. Barra = 10 μ m.

Figura 8 - Teste de lise com *Tetraselmis alacris*. 1 a 3: coradas com Giemsa. 4 a 6: coradas com Nitrato de Prata. 1: Controle, sem lise. 2: 2h na SLAI. 3: 4h na SLSA. 4: Controle, sem lise. 5: 2h na SLAI. 6: 4h na SLSA. As algas desta espécie não apresentaram lise celular em nenhuma das condições testadas. Barra = 10 μ m.

Figura 9 - Teste de lise com *Tetraselmis* sp. 1 e 2: coradas com Giemsa. 3 e 4: coradas com Nitrato de Prata. 1: Controle, sem lise. 2: 4h na SLSA. 3: Controle, sem lise. 4: 4h na SLSA. Barra = 10 μ m

Figura 10 - Teste de lise com *Tetraselmis* sp., coradas com Nitrato de Prata. 1: Controle, sem lise. 2: 5 min. na SLAI. 3: 2 h na SLAI. As algas desta espécie apresentaram lise celular parcial em todas as condições testadas de SLAI (5 min. a 2 h). Barra = 10 μ m.

Figura 11 - Teste de lise com *Tetraselmis gracilis*. 1 e 2: coradas com Giemsa. 3 e 4: coradas com Nitrato de Prata. 1: Controle, sem lise. 2: 4h na SLSA. 3: Controle, sem lise. 4: 4h na SLSA. Barra = 10 μ m.

Figura 12 - Teste de lise com *Tetraselmis gracilis*, coradas com Nitrato de Prata. 1: Controle, sem lise. 2: 5 min. na SLAI. 3: 2 h na SLAI. As algas desta espécie apresentaram lise celular parcial em todas as condições testadas de SLAI (5 min. a 2 h). Barra = 10 μ m

Figura 13 - Curva de crescimento de *D. tertiolecta* cultivada na sala de cultura, meio A. A linha azul representa o período característico de crescimento exponencial (fase log).

Figura 14 - Curva de crescimento de *D. tertiolecta* cultivada na incubadora, meio B-1. A seta indica o início da fase exponencial de crescimento.

Figura 15 – Curva de crescimento de *D. tertiolecta* cultivada na incubadora, meio B-2. A seta indica o início da fase exponencial de crescimento.

Figura 16 - Curva de crescimento de *D. tertiolecta* cultivada na incubadora, meio B-3. A seta indica o início da fase exponencial de crescimento.

Figura 17 – Frequência (%) de microalgas *D. tertiolecta* móveis após 1, 2 ou 4 h de exposição a diferentes concentrações de H₂O₂ no escuro. As médias são representadas pelas barras e os desvios padrão são representados pelas suíças. Tratamentos significativamente diferentes do controle com o mesmo tempo de exposição são representados por * ($p < 0,01$).

Figura 18 - Variação no Índice de Danos de cometa de *D. tertiolecta* em função de voltagem aplicada na eletroforese. Exposições em condições controle e 0,5 mM H_2O_2 por 1 h no escuro.

Figura 19 - Frequência (%) de microalgas *D. tertiolecta* móveis após 1, 2 ou 4 h de exposição a diferentes concentrações de 4NQO no escuro. As médias são representadas pelas barras e os desvios padrão são representados pelas suíças. Tratamentos significativamente diferentes do solvente com o mesmo tempo de exposição são representados por * ($p < 0,01$) e + ($p < 0,05$).

Figura 20 – Classificação de classes de danos em cometas de *D. tertiolecta*. Coloração: BrEt. Barra = 10 μm . Nota-se que o cometa classe 4, também chamado de *ghost*, não possui cabeça definida.

Figura 21 – Classificação de classes de danos em cometas de *D. tertiolecta*. Coloração: prata. Exposição a 4NQO. Barra = 10 µm. Nota-se que o cometa classe 4, também chamado de *ghost*, não possui cabeça definida.

(I)

(II)

Figura 22 - Momento de cauda e comprimento de cauda de *D. tertiolecta* expostas a diferentes concentrações de 4NQO por 1 h no Experimento 1. Coloração: BrEt. a, b: significativamente diferente do controle e do solvente, respectivamente ($p < 0,05$). I e II são réplicas.

Figura 23 - Comprimento da cauda de *D. tertiolecta* expostas a diferentes concentrações de 4NQO por 1 h no Experimento 1. I e II são réplicas. Réplica I corada com Brometo de Etídio (I-BrEt) e posteriormente com prata (I-prata); e réplica II corada com Brometo de Etídio (II-BrEt) e posteriormente com prata (II-prata). a, b: significativamente diferente do controle e do solvente, respectivamente ($p < 0,05$).

Figura 24 - Número de células de *D. tertiolecta* encontradas em cada classe de dano após exposição a diferentes concentrações de 4NQO por 1 h (I e II) . Resultados do Experimento 1, em réplica. Coloração: BrEt.

Figura 25 - Número de células de *D. tertiolecta* encontradas em cada classe de dano após exposição a diferentes concentrações de 4NQO por 1 h (I e II) . Resultados do Experimento 1, em réplica. Coloração: prata.

Figura 26 - Momento de cauda de *D. tertiolecta* expostas a diferentes concentrações de 4NQO no Experimento 2. Exposições por 1 h (I e II são réplicas), 2 h (III e IV são réplicas) e 4 h (V e VI são réplicas). Coloração: BrEt. a, b: significativamente diferente do controle e do solvente, respectivamente ($p < 0,05$).

Figura 27 - Número de células de *D. tertiolecta* encontradas em cada classe de dano após exposição a diferentes concentrações de 4NQO por 1 h (I e II) . Resultados do Experimento 2, em réplica. Coloração: BrEt.

Figura 28 - Número de células de *D. tertiolecta* encontradas em cada classe de dano após exposição a diferentes concentrações de 4NQO por 2 h (III e IV) . Resultados do Experimento 2, em réplica. Coloração: BrEt.

(V)

(VI)

Figura 29 - Número de células de *D. tertiolecta* encontradas em cada classe de dano após exposição a diferentes concentrações de 4NQO por 4 h (V e VI) . Resultados do Experimento 2, em réplica. Coloração: BrEt.

(A-1)

(B-1)

(A-2)

(B-2)

(A-3)

(B-3)

Figura 30 – Correlação de momento de cauda, comprimento da cauda e porcentagem de DNA na cauda *versus* ID. Dados obtidos dos experimentos 1 e 2 de exposição de *D. tertiolecta* a diferentes concentrações de 4NQO. Regressões obtidas considerando todos os dados (A-1 a A-3). Regressões obtidas após exclusão dos dados de lâminas com excesso de *ghosts* (exposições a 0,5 e 1 μ M de 4NQO) (B-1 a B-3).

(1h)

(2h)

(4h)

Figura 31 - Momento de cauda de *D. tertiolecta* exposta a diferentes concentrações de BAP por 1, 2 e 4 h. Coloração: BrEt. a, b: significativamente diferente do controle e do solvente, respectivamente ($p < 0,05$).

Figura 32 - Número de células de *D. tertiolecta* encontradas em cada classe de dano após exposição a diferentes concentrações de BAP por 1, 2 e 4 h. Coloração: BrEt.

10. ANEXO 3 – PREPARO DE SOLUÇÕES

Todos os reagentes usados devem ser analíticos (p.a.). Todas as soluções foram armazenadas em frascos âmbar.

10.1. Tampão Fosfato Salino (PBS)

(Dulbecco's PBS, Serva, sem Ca^{2+} e Mg^{2+} , pH 7,6 a 5°C)

(Composição: NaCl 8g/L, KCl 0,2 g/L, Na_2HPO_4 1,15 g/L, KH_2PO_4 0,2 g/L)

- PBS (Serva) 9,55 g
- Volume final (com dH_2O) 1000 mL

10.2. Solução Salina de Kenny

(0,4 M NaCl, 9 mM KCl, 0,7 mM K_2HPO_4 , 2 mM NaHCO_3)

- NaCl 11,69 g
- KCl 0,34 g
- K_2HPO_4 0,06 g
- NaHCO_3 0,08 g
- Volume final (com dH_2O) 500 mL

Armazenar na geladeira.

10.3. Agarose NMP 1,5%

- Agarose NMP 0,375 g
- Volume final (com dH_2O) 25 mL

Aquecer até a ebulição e total diluição.

Transferir para banho-maria a 60°C.

10.4. Agarose LMP 0,8%

- Agarose LMP 0,032 g
- Volume final (com Sol. Salina de Kenny) 4 mL

Aquecer até a ebulição e total diluição.

Transferir para banho-maria a 37°C.

Deixar no banho por pelo menos 20 min. antes de fazer a 2ª. camada.

10.5. Solução de Lise Alcalina Iônica

- Na₂EDTA 200 mM estoque
(pH 10,0) validade: 2 semanas
 - Na₂EDTA 7,44 g
 - Volume final (com dH₂O) 100 mL
 Ajustar para pH 10,0 com lentilhas de NaOH ou com NaOH 40%.
 Armazenar em temperatura ambiente.

- NaOH 10 M estoque
validade: 2 semanas
 - NaOH 40 g
 - Volume final (com dH₂O) 100 mL
 Dissolver o NaOH aos poucos.
 Armazenar em temperatura ambiente.

- Solução de Lise Alcalina Iônica final
(0,1% DSS, 300 mM NaOH, 30 mM Na₂EDTA, pH>13)
 - Na₂EDTA 200 mM estoque 22,5 mL
 - NaOH 10 M estoque 4,5 mL
 - DSS 0,1% 0,15 g
 - Volume final (com dH₂O) 150 mL
 Preparar no dia do uso. Usar em temperatura ambiente.

10.6. Solução de Lise Salina Aniônica

- Solução de Lise Salina Aniônica estoque
(pH 10)
 - NaCl 146,1 g
 - Na₂EDTA 37,2 g
 - Tris 1,2 g
 Adicionar os reagentes acima em ~700 mL de dH₂O.
 Adicionar ~8 g de NaOH e permitir que a mistura dissolva.

Ajustar o pH para 10 com NaOH 40%.

Adicionar 10 g de n-lauroil-sarcosinato.

Ajustar o volume final para 990 mL (O Triton X-100 vai aumentar o volume para a quantidade correta).

Armazenar em temperatura ambiente.

O n-lauroil-sarcosinato é um detergente não iônico, normalmente necessário para lisar células com extensa rede de filamentos intermediários (Gontijo *et al.*, 2001). Ele é irritante. Em caso de contato com olhos ou pele, enxaguar abundantemente em água corrente.

- Solução de Lise Salina Aniônica final

(2,5 M NaCl, 10 mM Tris, 0,1 M Na₂EDTA, 1% n-lauroil-sarcosinato, 1% Triton X-100)

- Triton X-100	1 mL
- Solução de lise estoque	99 mL

Preparar pelo menos 30 min. antes do uso. Usar gelada.

Em muitos protocolos de cometa é comum a adição de 10% DMSO na solução de lise final. O objetivo é tirar os radicais gerados pelo ferro liberado pela hemoglobina quando são usados tecidos de animais. Não é necessário em outras condições ou quando as lâminas são mantidas na solução de lise por um período de tempo curto.

10.7. Solução de Eletroforese

Usar Na₂EDTA 200 mM estoque e NaOH 10 M estoque descritos para Solução de Lise Alcalina Iônica

- Solução de Eletroforese final

(300 mM NaOH / 1 mM Na₂EDTA, pH>13)

- Na ₂ EDTA 200 mM estoque	3,75 mL
- NaOH 10 M estoque	22,5 mL
- Volume final (com dH ₂ O gelada)	750 mL

Preparar no dia do uso para cada corrida de eletroforese. Usar gelado (0 - 4°C).

Medir o pH antes do uso para verificar se está >13.

10.8. Solução de Neutralização

(0,4 M Tris, pH 7,5)

- Tris 97 g
- Volume final (com dH₂O) 2000 mL

Dissolver em ~1600 mL de dH₂O.

Ajustar o pH para 7,5 com HCl concentrado.

Completar o volume para 2000 mL.

Armazenar a temperatura ambiente.

10.9. Solução de Fixação A – prata

(15% CCl₃COOH, 5% ZnSO₄.7H₂O, 5% glicerol)

- Ácido tricloro acético 37,5 g
- Sulfato de zinco heptahidratado 22,27 g
- Glicerol 12,5 g
- Volume final (com dH₂O) 250 mL

Armazenar e usar a temperatura ambiente. Pode ser usada várias vezes.

10.10. Solução de Coloração – prata

- Solução B estoque – prata

(5% Na₂CO₃)

- Carbonato de sódio 25 g
- Volume final (com dH₂O) 500 mL

Armazenar a temperatura ambiente.

- Solução C estoque – prata

(0,02% NH₄NO₃, 0,02% AgNO₃, 0,1% H₄[Si(W₃O₁₀)₄].xH₂O, 0,05% formaldeído)

- Nitrato de amônia 0,20 g
- Nitrato de Prata 0,20 g
- Ácido Tugstosilícico 1,00 g

- Formaldeído (mín 37%) 500 μ L
- Volume final (com dH₂O) 1000 mL

Armazenar a temperatura ambiente.

- Solução de Coloração final (D)

Pré-aquecer os volumes necessários de Sol. B e C a 34°C em um banho-maria. Imediatamente antes de usar, despejar vagarosamente 68 mL da solução de C estoque em 32 mL de solução de B estoque. Agitar enquanto mistura as suas soluções.

10.11. Solução de Interrupção E – prata

(1% ácido acético)

- Ácido Acético Glacial 10 mL
- Volume final (com dH₂O) 1000 mL

Armazenar a temperatura ambiente.

10.12. Brometo de Etídio

- Brometo de Etídio estoque

(200 μ g/mL)

- Brometo de Etídio 0,02 g
- Volume final (com dH₂O) 100 mL

Armazenar a temperatura ambiente. Manter no escuro.

- Brometo de Etídio final

(5 μ g/mL)

- Brometo de Etídio estoque 50 μ L
- dH₂O 1950 μ L

Preparar logo antes do uso. Manter no escuro.

10.13. Giemsa

- Giemsa estoque (1X)

- Giemsa 0,76 g
- Glicerol (60°C) 50 mL
- Metanol 50 mL

Dissolver o Giemsa no Glicerol a 60°C. Esperar esfriar e adicionar o metanol.

Deixar a solução em repouso por 5 dias. Filtrar. Manter no escuro.

- Giemsa final (diluído 10X)

- Giemsa estoque (filtrar antes do uso) 10 mL
- dH₂O 90 mL

Preparar logo antes do uso.