



**PROTOCOLOS E METODOLOGIAS DO ENSAIO COMETA EM PEIXES:
UMA REVISÃO SISTEMÁTICA DA LITERATURA**

Alanna Garla¹

Thiago Henrique Gruener¹

Luciana Fernandes de Oliveira¹

Daniel Meneguello Limeira¹

RESUMO

O Ensaio Cometa é uma técnica largamente utilizada para detectar danos no DNA que consiste em englobar células em gel, provocar a lise das membranas e submeter à corrente elétrica, o que resulta em diferentes deslocamentos do DNA que podem indicar a presença de quebras. Essas quebras presentes no DNA de organismos aquáticos podem ser causadas por diversos contaminantes presentes em rios e lagos. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi analisar as metodologias empregadas nos trabalhos de biomonitoramento de ambientes aquáticos que utilizaram o Ensaio Cometa em peixes. Para isso, realizou-se uma revisão sistemática da literatura, através do Portal de Periódicos da CAPES, onde foram incluídos somente artigos onde a referida técnica foi aplicada em peixes. O Brasil foi o país com mais trabalhos (23,81%), seguido pela França, Portugal e Sérvia. Notou-se também que a maior parte dos experimentos foi realizada com peixes retirados diretamente do ambiente a ser investigado e uma grande variação das espécies utilizadas. A revisão demonstrou também variações sutis nos delineamentos experimentais, a depender dos objetivos de cada trabalho. Também foi possível verificar pequenas variações nas etapas de lise e de coloração, mas os protocolos, em geral, apresentaram certa uniformidade, constatando, assim, tendências nas adaptações requeridas no uso dessa técnica. Os dados aqui levantados podem auxiliar pesquisadores na padronização das técnicas de Ensaio Cometa, levando à economia de recursos e de tempo.

Palavras-chave: Ecotoxicologia, Genotoxicidade, Biomarcadores, Bioindicadores, Ictiofauna.

ABSTRACT

Protocols and Methodologies for Comet Assay in Fish: a Systematic Review. The Comet Assay is a technique widely used to detect DNA damage that consists of enclosing cells in a gel, causing membrane lysis and subjecting them to an electric current, which results in different displacements of the DNA that may indicate the presence of breaks. These breaks present in the DNA of aquatic organisms can be caused by various contaminants present in lakes and rivers. Thus, the objective of this work was to analyze the methodologies employed in biomonitoring works in aquatic environments that used the Comet Assay in fish. For this, a systematic literature review was carried out through the CAPES Journal Portal, which included only articles where this technique was applied to fish. Brazil was the country with the most papers (23.81%), followed by France, Portugal and Serbia. It was also noted that most of the experiments were carried out with fish taken directly from the environment to be investigated and a wide range of fish species

used. The review also showed subtle variations in the experimental designs, depending on the objectives of each work. It was also possible to verify small variations in the lysis and staining steps, but the protocols, in general, showed some uniformity, thus noting trends in the adaptations required in the use of this technique. The data collected here can help researchers to standardize Comet Assay techniques, leading to savings in resources and time.

Keywords: Ecotoxicology, Genotoxicity, Biomarkers, Bioindicators, Ichthyofauna.

INTRODUÇÃO

A água é um recurso essencial para a vida. Sua importância é inegável e desde a antiguidade é um indicador de desenvolvimento social. Apesar de muito abundante, 97% da água do planeta é salgada e 2% está em locais de difícil acesso, restando pouco volume próprio para o consumo (Victorino, 2007). A poluição da água por compostos químicos industriais, medicamentos, detergentes, produtos de limpeza e diversas outras substâncias colocam em risco a sua qualidade e disponibilidade para consumo (WWAP, 2018). Desta forma, para assegurar a qualidade deste importante recurso, o monitoramento dos ambientes aquáticos é de extrema importância (ANA, 2013).

Neste contexto, espécies ou comunidades podem ser utilizadas para indicar os efeitos da contaminação, por meio de sua presença/ausência ou composição, respectivamente (Nikinmaa, 2014). No biomonitoramento de ambientes aquáticos, destacam-se os peixes (Karr, 1981; Van der Oost et al., 2003) por apresentarem diversos atributos, tais como: posição na cadeia alimentar, ciclo de vida longo e desenvolvimento rápido (Zhou et al., 2008). Além das alterações observadas em nível de organização biológica maior que um indivíduo, estas podem ocorrer em nível subindividual. Estas alterações são chamadas de biomarcadores, que Depledge et al. (1995) definem como variações induzidas por agentes tóxicos em componentes moleculares ou celulares, processos, estruturas ou funções, determináveis em sistemas biológicos ou amostras.

Alterações moleculares são frequentemente utilizadas como biomarcadores. Estas podem ocorrer, por exemplo, por compostos genotóxicos que interagem direta ou indiretamente com o DNA, causando danos, que podem ou não ser reversíveis dependendo do funcionamento dos mecanismos de reparo (Sisinno e Oliveira-Filho, 2013). Uma forma de mensurar estes danos é por meio do Ensaio Cometa, que é uma técnica muito usada, considerada muito sensível e de baixo custo (Collins, 2004).

O princípio da técnica baseia-se em englobar células em gel, em seguida promover a lise das membranas e expor o DNA a uma corrente elétrica. Desta forma, fragmentos de DNA nuclear serão atraídos de modo diferenciado para o polo positivo a depender do seu tamanho, uma vez que a molécula tem predominância de cargas negativas. O DNA de cada célula conterá um nucleóide, porção de DNA não fragmentado que aparecem com formato de um círculo preenchido, além de porções de DNA fragmentado que terão um aspecto de “cauda de cometa”, o que dá o nome à técnica. O padrão de dano no DNA pode ser qualificado ou quantificado por meio desta técnica considerando-se o tamanho (Silva, 2007), a intensidade de fluorescência ou a porcentagem de DNA da cauda; sendo, atualmente, possível a utilização de softwares especializados para este fim. Quando considerado o tamanho da cauda, o dano ao DNA é expresso em

termos de uma pontuação calculada, na qual as 100 células analisadas de cada indivíduo são classificadas de acordo com os danos exibidos: classe 0 = ausência de cauda de cometa; classe 1 = cauda de cometa menor que o diâmetro do nucleóide; classe 2 = cauda de cometa maior que o diâmetro do nucleóide; classe 3 = cauda de cometa com mais de duas vezes o diâmetro do nucleóide. Existem variações destas classes, podendo alguns autores preferirem utilizar uma maior quantidade.

O Ensaio Cometa alcalino exige a realização das seguintes etapas: (1ª) isolar as células em uma suspensão; (2ª) colocar essas células em lâmina com gel de agarose; (3ª) lisar as membranas; (4ª) tratar com solução alcalina auxiliando na desnaturação do DNA e na detecção de fragmentos de DNA gerados por quebras de fita dupla, fita simples, e sítios álcali lábeis, além de sítios apurínicos/apirimidínicos; (5ª) submeter à eletroforese; (6ª) lavar com solução neutralizante; (7ª) realizar a coloração e visualização dos cometas e (8ª) análise dos resultados (Møller et al., 2020).

Há mais de 25 anos, Fairbairn et al. (1995) realizaram uma revisão sobre as metodologias utilizadas no Ensaio Cometa, enfatizando a variedade de aplicações e protocolos existentes. É possível que, nesse ínterim, novas técnicas, aplicações ou metodologias tenham surgido. Associado a isso, Koppen et al. (2017) mencionam a problemática da padronização e adequação do protocolo nos testes e Belpaeme et al. (1998) expõem que a capacidade do ensaio em detectar danos está muito relacionada com as condições experimentais, espécie e tipo celular utilizados.

Tendo em vista a importância de monitorar ambientes aquáticos e a necessidade de utilizar um protocolo adequado, o presente trabalho teve como objetivo analisar as metodologias executadas nos estudos de biomonitoramento de ambientes aquáticos que utilizaram o Ensaio Cometa em peixes como bioindicadores, por meio de uma revisão sistemática da literatura presente no Portal de Periódicos da CAPES. Na sequência, buscou-se identificar padrões nos protocolos de cada etapa da referida técnica.

MÉTODOS

A revisão sistemática da literatura foi realizada entre os meses 05 e 08 de 2020, integralmente no Portal de Periódicos da CAPES (<http://www-periodicos-capes-gov-br.ezl.periodicos.capes.gov.br/index.php?>), que compila dados das mais relevantes bases de periódicos científicos do mundo. Foram incluídos artigos publicados até maio de 2020. Foram buscados artigos que contivessem, em qualquer campo (título, autor ou assunto), os seguintes descritores: “comet assay” AND “aquatic environment” AND “biomonitoring” AND “fish”, utilizando os operadores booleanos como descrito acima. Foram excluídos resultados que não eram artigos científicos revisados por pares e cujo idioma não era em inglês. Os critérios de inclusão foram: (a) trabalhos que tinham como objetivo avaliar a qualidade de ambientes aquáticos e (b) trabalhos que utilizaram o Ensaio Cometa em peixes e/ou culturas celulares de peixes, tendo ou não utilizado outras técnicas.

Para diminuir os vieses na análise, a busca de artigos em todas as suas etapas, foi realizada em duplicata, por dois autores em momentos diferentes, conforme diagrama apresentado na figura 1. Para a tomada de decisão para a inclusão ou não nas análises, foram lidos inicialmente os títulos e os resumos dos artigos e, caso incluídos, os artigos foram lidos integralmente.

Após a leitura de todos os artigos, notou-se que os experimentos realizados nesses trabalhos poderiam ser classificados em três classes. Cabe destacar que alguns dos trabalhos realizaram mais de um experimento, sendo classificados em mais de uma classe. São elas:

- Classe I: trabalhos feitos com peixes coletados diretamente de ambiente a ser investigado. Nestes trabalhos, o objetivo foi avaliar o padrão de danos presente no peixe coletado no ambiente.

- Classe II: trabalhos realizados com água coletada do ambiente e posterior exposição dos peixes (ou de células de peixes cultivadas *in vitro*) que eram provenientes de outro local (geralmente biotério) ou que expuseram os peixes diretamente no corpo d'água. Para estes trabalhos, o objetivo foi testar o potencial de danos ao DNA induzidos pela água.

Devido a essa categoria contemplar diferentes abordagens experimentais, fez-se necessário subclassificar os experimentos da seguinte forma: *in situ*, quando o experimento foi conduzido no próprio ambiente (corpo d'água) a ser investigado; *ex situ*, quando o experimento foi conduzido em laboratório; e *in vitro*, quando o experimento usou cultura de células.

- Classe III: trabalhos que simularam condições químicas do corpo d'água e posterior exposição de peixes. Nestes trabalhos, o objetivo foi testar o potencial causador de danos ao DNA de moléculas que podem estar presentes em águas ambientais.

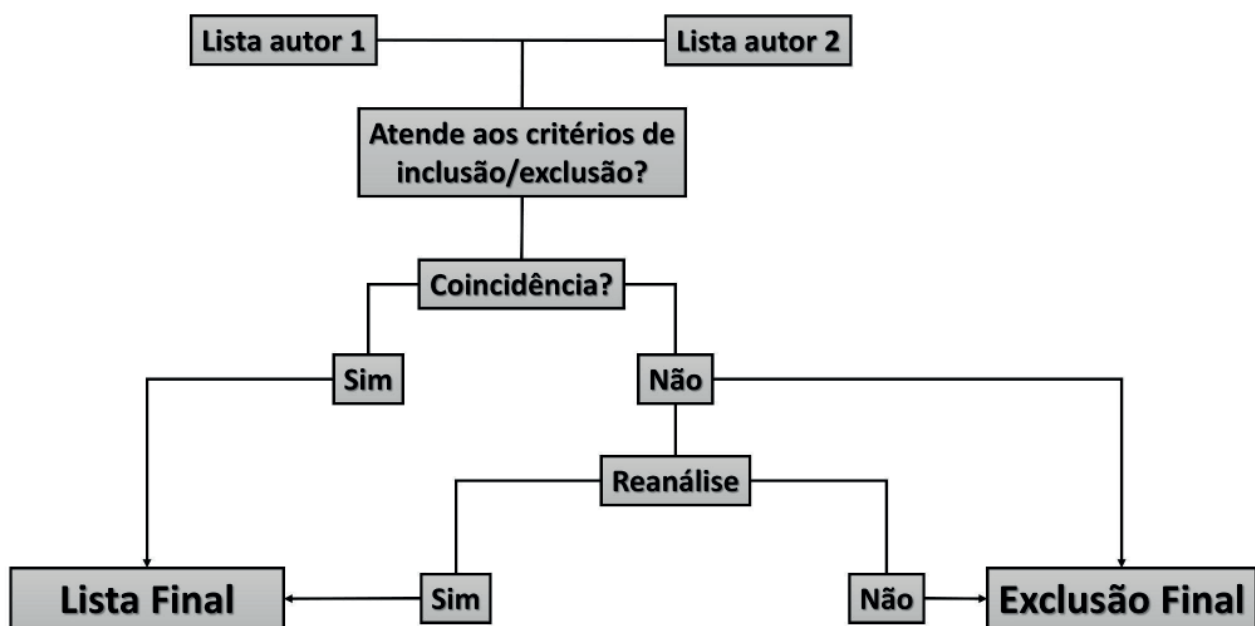


Figura 1. Fluxograma de análise para a tomada de decisão para a inclusão/exclusão na revisão sistemática sobre a utilização do Ensaio Cometa em peixes.

De acordo com as informações fornecidas pelos artigos, foi possível analisar os seguintes itens: país da pesquisa, a forma de exposição do peixe ao agente potencialmente contaminante (abordagem experimental), a origem dos espécimes, as espécies utilizadas e o protocolo de aplicação do Ensaio Cometa (autoria, tipo de célula ou tecido utilizado, lise, tratamento com solução alcalina, neutralização e coloração).

RESULTADOS

A busca inicial levantou 127 artigos não repetidos, após a leitura dos resumos e aplicação dos critérios de inclusão, 21 artigos foram incluídos nas análises (tabela 1). Destes, 23,81% tratavam-se de pesquisas realizadas no Brasil e 76,19% foram feitas no exterior (tabela 2). Uma análise ainda mais minuciosa revelou que os trabalhos foram feitos em 12 países diferentes: Brasil (5), França (3), Portugal (3), Sérvia (3), Croácia (2), Índia (2), Alemanha (1), Argentina (1), Egito (1), Eslovênia (1) e México (1). Vale comentar que Kolarevic et al. (2016b) avaliaram 3 países que o Rio Sava percorre (Eslovênia, Croácia e Sérvia), desta forma há um total de 23 localidades entre todos os trabalhos.

Quanto ao delineamento experimental, 43,48% dos experimentos foram considerados como sendo da classe I, 34,78% da classe II e 21,74% da classe III. A quantidade de experimentos realizados *in situ*, *ex situ* e *in vitro* correspondente à classe II, bem como as relativas porcentagens, estão apresentados na tabela 2.

A maior parte (47,62%) dos trabalhos utilizou peixes coletados diretamente do ambiente. A segunda origem mais comum foi de peixes oriundos de, conforme citado pelos autores, cativeiro, fazenda ou criados em laboratório. Para efeito de organização, todas essas origens foram compiladas como biotérios e representaram 33,33% dos trabalhos, além disso 9,52% coletaram peixes de ambiente não contaminado, 4,76% utilizaram cultura de células e 4,76% não mencionaram a proveniência dos exemplares (tabela 2).

Quanto aos tecidos biológicos utilizados para os ensaios, seis opções diferentes foram encontradas: sangue (60,71%), fígado (17,86%), rins (3,75%), gônadas (3,75%), brânquias (10,71%) e músculo (3,75%) (tabela 2). Um dos trabalhos fez um pool de tecidos, logo não foi possível classificá-lo quanto ao material biológico analisado.

Tabela 1. Artigos analisados na revisão sistemática sobre a utilização do Ensaio Cometa em peixes.

REFERÊNCIA	TÍTULO	PAÍS
Benassi et al. (2006)	Evaluation of Remediation of Coal Mining Wastewater by Chitosan Microspheres Using Biomarkers.	Brasil
Coppo et al. (2018)	Genotoxic, biochemical and bioconcentration effects of manganese on <i>Oreochromis niloticus</i> (Cichlidae).	Brasil
Evrard et al. (2013)	Responses of juvenile European flounder (<i>Platichthys flesus</i>) to multistress in the Vilaine estuary, during a 6-month survey.	França
Fatima et al. (2014)	Assessment of Genotoxic Induction and Deterioration of Fish Quality in Commercial Species Due to Heavy-Metal Exposure in an Urban Reservoir.	Índia
García-Nieto et al. (2014)	Genotoxicological Response of the Common Carp (<i>Cyprinus carpio</i>) Exposed to Spring Water in Tlaxcala, México.	México
Grinevicius et al. (2009)	Textile Effluents Induce Biomarkers of Acute Toxicity, Oxidative Stress, and Genotoxicity.	Brasil
Guerriero et al. (2018)	Biological responses of white sea bream (<i>Diplodus sargus</i> , Linnaeus 1758) and sardine (<i>Sardine pilchardus</i> , Walbaum 1792) exposed to heavy metal contaminated water.	Egito
Guilherme et al. (2010)	European eel (<i>Anguilla anguilla</i>) genotoxic and pro-oxidant responses following short-term exposure to Roundup-a glyphosate-based herbicide.	Portugal
Guilherme et al. (2014)	DNA and chromosomal damage induced in fish (<i>Anguilla anguilla</i> L.) by aminomethylphosphonic acid (AMPA)—the major environmental breakdown product of glyphosate.	Portugal
Kolarevic et al. (2016b)	Evaluation of Genotoxic Pressure along the Sava River.	Eslovênia, Croácia e Sérvia
Le Bihanic et al. (2014)	Developmental toxicity of PAH mixtures in fish early life stages. Part I: adverse effects in rainbow trout.	França
Le Guernic et al. (2016)	Acclimation capacity of the three-spined stickleback (<i>Gasterosteus aculeatus</i> , L.) to a sudden biological stress following a polymetallic exposure.	França
Nagpure et al. (2016)	Mutagenic, genotoxic and bioaccumulative potentials of tannery effluents in freshwater fishes of River Ganga.	Índia
Nehls e Segner (2005)	Comet assay with the fish cell line rainbow trout gonad-2 for in vitro genotoxicity testing of xenobiotics and surface waters.	Alemanha
Ossana et al. (2019)	Histological, Genotoxic, and Biochemical Effects on <i>Cnesterodon decemmaculatus</i> (Jenyns 1842) (Cyprinodontiformes, Poeciliidae): Early Response Bioassays to Assess the Impact of Receiving Waters.	Argentina
Pereira et al. (2010)	Evaluation of DNA Damage Induced by Environmental Exposure to Mercury in <i>Liza aurata</i> Using the Comet Assay.	Portugal
Ramsdorf et al. (2012)	Handling of <i>Astyanax</i> sp. for biomonitoring in Cangüiri Farm within a fountainhead (Irai River Environment Preservation Area) through the use of genetic biomarkers.	Brasil
Scalon et al. (2013)	Genotoxic Potential and Physicochemical Parameters of Sinos River, Southern Brazil.	Brasil
Sunjog et al. (2012)	Heavy Metal Accumulation and the Genotoxicity in Barbel (<i>Barbus barbus</i>) as Indicators of the Danube River Pollution.	Sérvia
Sunjog et al. (2013)	Comparison of comet assay parameters for estimation of genotoxicity by sum of ranking differences.	Sérvia
Ternjej et al. (2010)	Estimation of DNA Integrity in Blood Cells of Eastern Mosquitofish (<i>Gambusia holbrooki</i>) Inhabiting an Aluminium-Polluted Water Environment: an Alkaline Comet Assay Study.	Croácia

Tabela 2. Naturezas dos trabalhos (conforme classificação aqui adotada), locais de exposição do material biológico ao agente contaminante, origens dos exemplares utilizados como bioindicadores, países onde os trabalhos foram realizados e tecidos biológicos utilizados nos artigos levantados na revisão sistemática sobre a utilização do Ensaio Cometa em peixes.

Naturezas dos trabalhos			Locais de exposição - Classe II				
	Classe I	Classe II	Classe III	<i>in situ</i>	<i>ex situ</i>	<i>in vitro</i>	
N	10	8	5	2	5	1	
%	43,48	34,78	21,74	25	62,5	12,5	
Origem dos exemplares						Países de realização	
	Ambiente analisado	Ambiente não contaminado	Biotério	Cultura de células	Não mencionado	Brasil	Exterior
N	10	2	7	1	1	5	16
%	47,62	9,52	33,33	4,76	4,76	23,81	76,19
Tecidos biológicos							
	Sangue	Fígado	Rins	Gônadas	Brânquias	Músculo	
N	17	5	1	1	3	1	
%	60,71	17,86	3,57	3,57	10,71	3,57	

Quanto aos protocolos executados, identificou-se variações (figura 2). Dentre os 21 artigos, foram usados 10 protocolos diferentes, sendo que Singh et al. (1988) foi a citação mais recorrente com 10 artigos; duas citações de Tice et al. (2000) e uma citação para cada uma das outras sete referências presentes na figura 2. Dois artigos não mencionaram a referência do protocolo adotado.

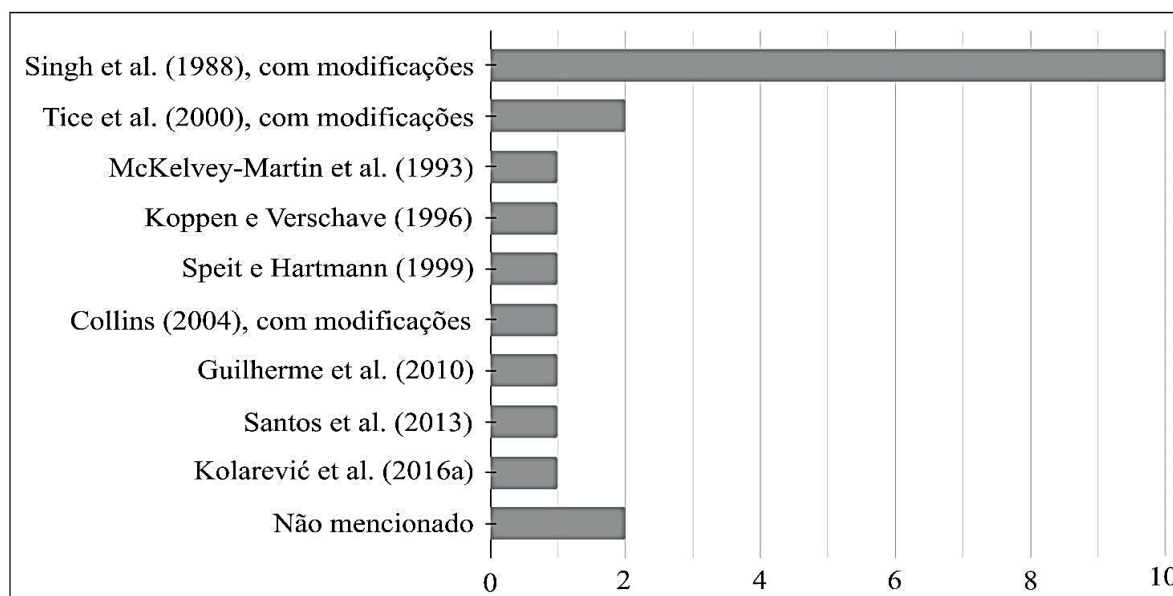


Figura 2. Número de vezes que foram citados os protocolos utilizados nos artigos levantados na revisão sistemática sobre a utilização do Ensaio Cometa em peixes.

Para a realização dos ensaios, foram usadas 23 espécies diferentes, distribuídas em 14 famílias e 11 ordens. Dos cinco trabalhos realizados no Brasil, três usaram espécies exóticas. A lista de espécies utilizadas, pode ser visualizada na tabela 3.

Tabela 3. Espécies de peixes utilizadas nos artigos levantados na revisão sistemática sobre a utilização do Ensaio Cometa em peixes.

Ordem	Família	Espécie	Nº de trabalhos		
Anguilliformes	Anguillidae	<i>Anguilla anguilla</i>	2		
Characiformes	Characidae	<i>Astyanax</i> sp.	1		
		<i>Hyphessobrycon luetkenii</i>	1		
Clupeiformes	Clupeidae	<i>Sardine pilchardus</i>	1		
Cypriniformes	Cyprinidae	<i>Alburnoides bipunctatus</i>	1		
		<i>Alburnus alburnus</i>	1		
		<i>Barbus barbus</i>	1		
		<i>Cyprinus carpio</i>	1		
		<i>Danio rerio</i>	1		
		<i>Labeo calbasu</i>	1		
		<i>Puntius sophore</i>	1		
		<i>Squalius cephalus</i>	1		
		Cyprinodontiformes	Poeciliidae	<i>Cnesterodon decemmaculatus</i>	1
				<i>Gambusia holbrooki</i>	1
Gasterosteiformes	Gasterosteidae	<i>Gasterosteus aculeatus</i>	1		
Mugiliformes	Mugilidae	<i>Liza aurata</i>	1		
Perciformes	Channidae	<i>Channa striatus</i>	1		
	Cichlidae	<i>Oreochromis niloticus</i>	2		
	Sparidae	<i>Diplodus sargus</i>	1		
Pleuronectiformes	Pleuronectidae	<i>Platichthys flesus</i>	1		
Salmoniformes	Salmonidae	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	2		
Siluriformes	Bagridae	<i>Mystus vittatus</i>	1		
	Heteropneustidae	<i>Heteropneustes fossilis</i>	1		

A análise pormenorizada dos protocolos da etapa de lise demonstrou alguns padrões na preparação da solução. Quatro reagentes foram utilizados em todos os trabalhos, sendo eles: o cloreto de sódio (NaCl), o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), o TRIS e o TRITON X-100. Todos os trabalhos usaram NaCl a 2,5 M, EDTA a 0,1 M (sendo que oito deles citaram a utilização de EDTA dissódico (Na₂EDTA) e Tris a 0,01 M. Já o TRITON X-100 foi utilizado em 17 trabalhos a uma concentração de 1% e em quatro a 1,5%. Outros dois reagentes foram utilizados em diversos trabalhos, porém não em todos. Quinze usaram Dimetilsulfóxido (DMSO) a 10% e sete usaram Lauril Sarcocinato de Sódio a 1%. Todas as soluções de lise foram padronizadas em pH = 10.

Houve variação no tempo de lise (de 1 h a 24 h), indicadas na figura 3A, porém na maioria dos trabalhos (71%) o tempo foi de 1 h.

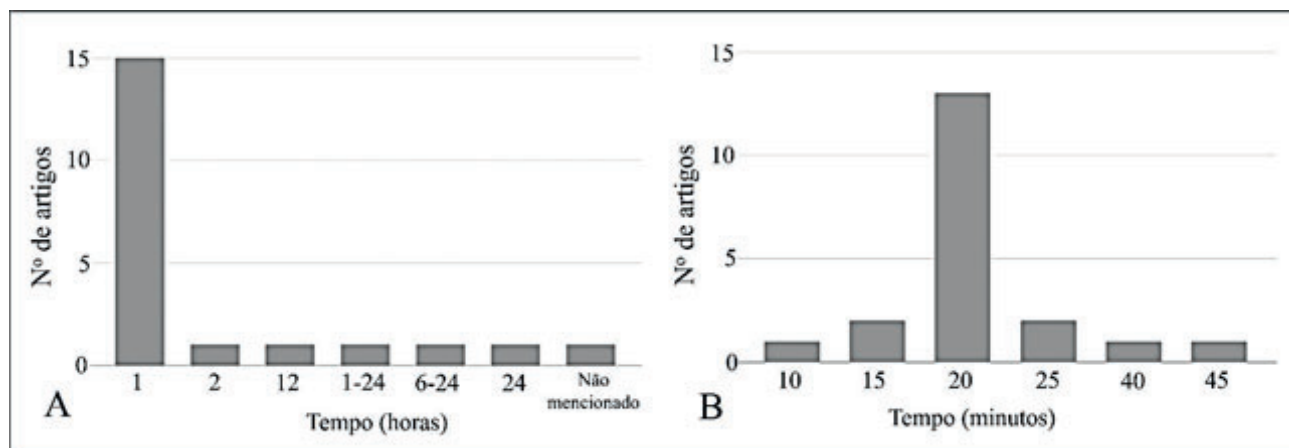


Figura 3. Tempos de lise (A) e tempo de descanso no tampão de eletroforese (B) para os artigos levantados na revisão sistemática sobre a utilização do Ensaio Cometa em peixes.

A solução de eletroforese, quase unanimemente, foi utilizada com NaOH a 300 mM, EDTA a 1 mM e pH = 13, com exceção de Pereira et al. (2010), que adicionaram 0,1% de 8-hidroxiquinolina e 2% de DMSO, e de Ramsdorf et al. (2012), que utilizaram diferentes concentrações (0,25 M de NaOH e 200 mM de EDTA). Já Benassi et al. (2006) e Grinevicius et al. (2009) usaram 0,3 mM de NaOH. O tempo de descanso das lâminas no tampão de eletroforese, que é a etapa que precede a eletroforese, foi predominantemente de 20 minutos (Figura 3B).

Para as condições de eletroforese, apenas a metade dos trabalhos citou a voltagem por centímetro utilizada. Segundo Møller et al. (2020), a migração do DNA durante a eletroforese é proporcional à força do campo eletroforético e a duração. Desta forma, como o tempo de eletroforese depende dos parâmetros do campo eletromagnético (e. g.: voltagem e amperagem) não foi possível identificar um padrão para realizar a comparação entre os trabalhos.

Na etapa de neutralização, a aplicação do tampão neutralizador foi unanimidade, pois todos os estudos usaram 0,4 M Tris pH = 7,5. Já as técnicas de coloração foram variadas. A maior parte dos trabalhos (71%) usou brometo de etídio. O segundo reagente mais utilizado foi o Nitrato de Prata, com variadas preparações (14% dos trabalhos). Outros dois corantes utilizados foram a Laranja de Acridina (9,5%) e 4',6'-Diamino-2-Fenil-indol (5,5%). O primeiro trabalho que não utilizou brometo de etídio foi publicado em 2013. A partir deste ano, percebe-se que 54% dos trabalhos utilizou brometo de etídio enquanto 46% utilizou outro reagente, estes dados estão ilustrados na figura 4.

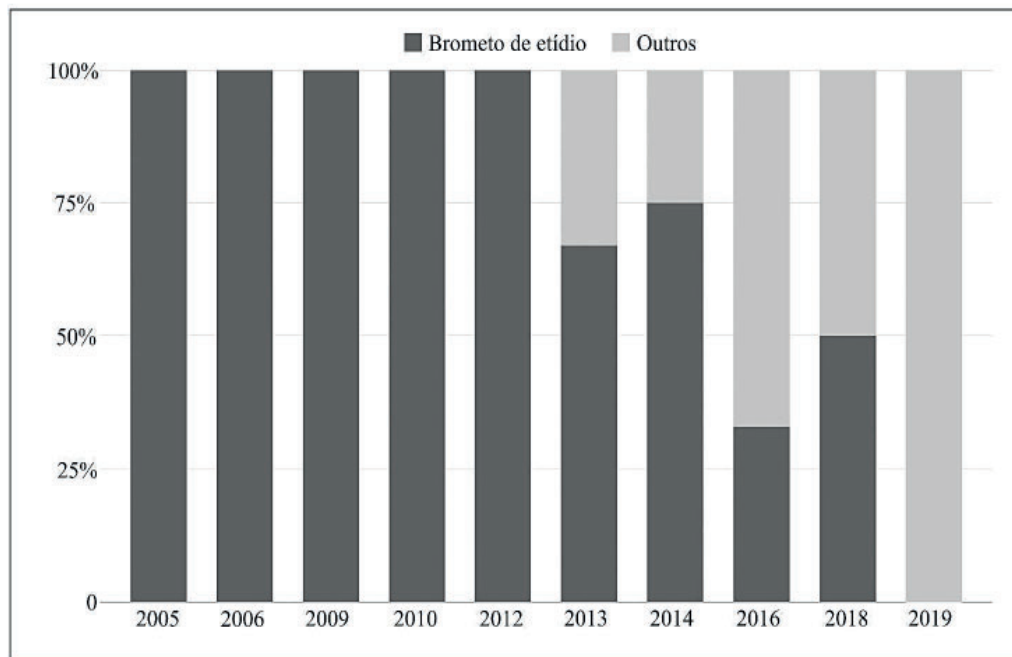


Figura 4. Reagentes utilizados na etapa de coloração os artigos levantados na revisão sistemática sobre a utilização do Ensaio Cometa em peixes.

Não foi possível identificar relação alguma entre os protocolos e os tecidos biológicos utilizados, bem para a escolha dos reagentes da solução de lise e para o tempo de lise.

DISCUSSÃO

Os resultados demonstraram que os países europeus foram responsáveis pela produção da maior parte dos trabalhos (52,38%). Esse dado converge com a análise de Koppen et al. (2017), que apresentam a emblemática pouca representatividade de países fora da Europa nas pesquisas que utilizam o Ensaio Cometa.

O estudo bibliométrico de Neri et al. (2015) demonstrou uma tendência no aumento do uso do Ensaio Cometa em países emergentes. Esta informação também pode estar de acordo com o presente levantamento, já que os trabalhos de países emergentes representaram quase 50% do total, e foram produzidos por Brasil, Índia, Argentina, Egito e México.

O Brasil teve destaque com o maior número de trabalhos. Esse resultado se deve possivelmente à quantidade expressiva da aplicação desta técnica com peixes no país que vem sendo usada historicamente. Segundo Dalzochio et al. (2016), mais de 60% das pesquisas como Ensaio Cometa no Brasil são realizadas exclusivamente com peixes, aliado a isso, de acordo com Neri et al. (2015), o Brasil está na lista dos países que tiveram um aumento na produção científica da área. Outro fator que ajuda explicar a liderança do Brasil neste tipo de trabalho é a enorme rede hidrográfica brasileira e a maior biodiversidade de peixes do mundo (Reis et al., 2003).

Analisando especificamente os trabalhos brasileiros, quatro experimentos foram realizados na região sul e um na região sudeste, congruente com a afirmação de Dalzochio et al. (2016), que demonstraram que essas regiões concentram 80% de todas as publicações do país.

Quanto ao delineamento experimental, constatou-se a prevalência da classe I (43,48%), a qual analisou o peixe diretamente do ambiente, assim como a maior parte dos exemplares utilizados nos ensaios foram coletados diretamente de ambiente supostamente contaminado (47,62%). De acordo com Rand et al. (1995), os experimentos em campo são mais realistas que os conduzidos no laboratório, visto que abrangem a complexidade dos ambientes e, assim, segundo o mesmo autor, seriam mais indicados para estudos de biomonitoramento. Essa observação pode justificar a preferência por esse tipo de abordagem. Todavia, Rand et al. (1995) também ressaltam que os experimentos em laboratório são os que permitem uma melhor compreensão dos efeitos dos contaminantes ao excluir variáveis, porém possui limitações: não contemplam as interações entre substâncias, biodisponibilidade dos químicos e as características do substrato.

Outro ponto muito importante na organização do experimento é a escolha da espécie, ou seja o modelo de estudo. Essa escolha é crucial, uma vez que cada organismo possui atributos que os tornam mais adequados e sensíveis para um determinado teste. Dos artigos, apenas sete deixaram explícito a justificativa da escolha, a qual em sua maioria estava relacionada com a presença do peixe no ambiente analisado, sendo esses: *Oreochromis niloticus* (Coppo et al., 2018), *Platichthys flesus* (Evrard et al., 2013), *Channa striatus* e *Heteropneustes fossilis* (Fátima et al., 2014), *Gasterosteus aculeatus* (Le Guernic et al., 2016) e, por fim, *Labeo calbasu*, *Puntius sophore* e *Mystus vittatus* (Nagpure et al., 2016). Também foi citada a importância alimentar de *Diplodus sargus* e *Sardine pilchardus* (Guerriero et al., 2018), o valor econômico de *Heteropneustes fossilis* (Fátima et al., 2014), a sensibilidade à alterações ambientes de *Cyprinus carpio* (Garcia Nieto et al., 2014) e vários estudos com *Gambusia holbrooki* (Ternjej et al., 2010).

Apenas dois trabalhos dos cinco realizados no Brasil utilizaram espécies nativas (*Hyphessobrycon luetkenii* e *Astyanax* sp.). As espécies exóticas utilizadas (*Oreochromis niloticus* e *Danio rerio*) são reconhecidamente de fácil cultivo e cujos protocolos experimentais estão bem estabelecidos, além de serem de fácil aquisição (Coppo et al., 2018).

Para os tecidos utilizados, a preferência por sangue (60,71%) e fígado (17,86%) pode ser explicada pelas características histológicas e fisiológicas de cada um deles. Segundo Belpaeme et al. (1998), geralmente usa-se sangue devido ao fato de não exigir etapas de processamento e a amostragem ser mais fácil. Os autores ainda destacam a utilização de fígado por ser um órgão metabolizador, das brânquias por estarem em constante contato com a água e dos rins por filtrarem o sangue.

A maior parte dos trabalhos utilizou o protocolo de Singh et al. (1988), mesmo que com modificações. O presente trabalho não encontrou ligação entre as adaptações nos protocolos e os objetos de investigação das pesquisas. Além disso, os trabalhos realizados no Brasil não utilizaram técnicas diferentes de outros países. O mesmo foi encontrado por Dalzochio et al. (2016).

O desenvolvimento das técnicas utilizadas no Ensaio Cometa recebeu contribuição de diversos autores. Porém, Singh et al. (1994) destacam-se por utilizar eletroforese em condições alcalinas (pH>13). Apesar de não terem sido os primeiros a desenvolver a técnica, foi a partir desta versão que a aplicação do DNA Cometa aumentou imensamente (Tice et al., 2000).

Rydberg e Johanson (1978) foram os primeiros a apresentar resultados preliminares da avaliação de danos no DNA em células individuais. Neste ensaio, usou-se células de hamster chinês submetidas

a condições alcalinas suaves ($\text{pH} \geq 12$), coradas com laranja de acridina. Posteriormente, no mesmo laboratório, Ostling e Johanson (1984) realizaram uma adaptação de pH (para 9,5) para a eletroforese fraca (5 V/cm por 5 min), também corando com laranja de acridina. Quatro anos depois, Singh et al. (1988), com o intuito de tornar a técnica mais sensível, divulgaram uma versão alcalina com grande potencial de identificar quebras de fita simples e de sítios alcalinos lábeis. Eles utilizaram linfócitos humanos submetidos à lise com $\text{pH} = 10$ e coraram com brometo de etídio. Segundo Speit e Hartmann (2006), a maioria dos agentes genotóxicos provocam quebras de fita simples e lesões álcali-lábeis, sendo a versão alcalina ($\text{pH} > 13$) a mais sensível porque detecta justamente esses danos.

Por conta da maioria dos experimentos terem se apropriado do mesmo protocolo, existem muitas semelhanças nas etapas. Isso ficou evidente na preparação da solução de lise, visto que Singh et al. (1988) utilizou os seguintes reagentes: EDTA a 0,1 M, NaCl a 2,5 M, 1% de Lauril Sarcosinato de Sódio e 0,01 M Trizma base ajustado para $\text{pH} 10$, por fim 1% de Triton X-100. E todos os artigos levantados colocaram NaCl a 2,5 M, EDTA ou Na_2EDTA a 0,1 M, Tris a 0,01 M e $\text{pH} 10$, além de um recorrente uso de Triton X-100. Apenas sete trabalhos usaram Lauril Sarcosinato de Sódio a 1%; segundo Tice et al. (2000), não são todos os tipos celulares que exigem esse reagente como um segundo detergente (já que a utilização de Triton X-100 é bem mais comum) e a necessidade de adição deve ser avaliada caso a caso. A adição de DMSO previne danos causados ao DNA por radicais de ferro advindos da lise de eritrócitos (Tice et al., 2000). Quinze artigos fizeram uso de DMSO.

A etapa de lise tem por objetivo o rompimento das membranas celulares. Para isso, a solução de lise é constituída por sais e detergentes. Desta forma, o tempo está intimamente relacionado com o tipo celular (Tice et al., 2000). Na maioria dos trabalhos (71%) o tempo foi de uma hora; o mesmo foi encontrado no levantamento feito por Fairbairn et al. (1995). Todavia, não foi possível estabelecer essa relação nos artigos levantados, uma vez que os mesmos tipos celulares apresentaram variações no tempo de lise.

A solução de eletroforese também apresentou uma tendência no uso de 2 reagentes: NaOH a 300 mM e EDTA a 1 mM, com $\text{pH} = 13$, o que reflete o protocolo de eletroforese alcalina mais comumente utilizado, Singh et al. (1988). Para Møller et al. (2020), a composição da solução de eletroforese pode afetar na conversão de locais álcali-lábeis para quebras de fita de DNA e quanto maior o tempo mais conversões ocorrem. Além disso, possíveis elevações da temperatura podem interferir na separação das fitas, sendo este um fator que influenciador dos resultados. Assim, percebe-se que a importância da padronização das técnicas, ao menos dentro de um mesmo evento experimental, é de suma importância e impede possíveis vieses.

Todos os trabalhos analisados realizaram neutralização com Tris a 0,4 M e $\text{pH} = 7,5$, tal como proposto por Singh et al. (1988). Segundo Møller et al. (2020), após a eletroforese deve ser realizada a neutralização com o intuito de remover o excesso de solução alcalina para que seja possível a realização da coloração.

Na etapa de coloração, embora o brometo de etídio tenha sido o principal corante utilizado, nota-se, a partir de 2013, uma tendência de aumento na utilização de métodos de coloração alternativos. O brometo de etídio é um intercalante no DNA muito utilizado em laboratórios e biologia molecular. Talvez esta tendência esteja relacionada com os efeitos mutagênicos do brometo de etídio (Heinen, 1978; Lunn e Sansone, 1987). Percebeu-se também que, dentre os trabalhos realizados no Brasil, três utilizaram brometo

de etídio, enquanto dois utilizaram Nitrato de Prata.

Por fim, na visão de Møller et al. (2020), é importante que os artigos forneçam detalhes específicos das adequações nas técnicas, bem como das justificativas. Na visão dos autores, existem informações mínimas que devem ser fornecidas para que qualquer pesquisador consiga interpretar o experimento. Assim, na presente revisão, pôde-se notar que pequenos ajustes de técnicas, não foram citados nos artigos analisados. Em alguns casos, os trabalhos citavam a referência seguida do termo “com pequenas modificações”.

Há de se considerar que um dos objetivos desta revisão foi a busca dentro do Portal de Periódicos da Capes. Desta forma, é possível que outros trabalhos que realizaram Ensaio Cometa em peixes não tenham sido compilados. Porém, nota-se que os trabalhos aqui revisados estão bem distribuídos pelo mundo e pode-se considerar que representam bem o panorama de utilização da técnica.

A presente revisão demonstrou que o Ensaio Cometa é bastante utilizado em estudos de biomonitoramento de ambientes aquáticos que utilizam peixes como bioindicadores. As variações na técnica, da etapa de lise até a coloração do material apresenta diferenças pontuais, enquanto o delineamento experimental pode variar a depender dos objetivos do trabalho. Os dados aqui apresentados podem auxiliar pesquisadores na elaboração de protocolos que sejam funcionais para sua realidade, já que essa padronização inicial requer um ponto de partida. De maneira semelhante, podem indicar caminhos alternativos para resolver problemas laboratoriais, que podem levar à estagnação de um projeto de pesquisa ou protocolos mais seguros à saúde de pesquisadores, como a não utilização de brometo de etídio.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao IFPR (Instituto Federal do Paraná), à FAPESC (Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina) e ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo aporte financeiro para o desenvolvimento deste trabalho.

REFERÊNCIAS

- ANA, Agência Nacional de Águas. 2013. **Cuidando das águas**: soluções para melhorar a qualidade dos recursos hídricos. 2. ed. Distrito Federal: ANA, 157p. Disponível em: <<https://arquivos.ana.gov.br/institucional/sgc/CEDOC/Catalogo/2013/CuidandoDasAguas-Solucao2aEd.pdf>>. Acesso em: 14 jan. 2021.
- BELPAEME, K.; COOREMAN, K.; KIRSCH-VOLDERS, M. 1998. Development and validation of the in vivo alkaline comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, **415**(3):167-184.
- BENASSI, J. C. et al. 2006. Evaluation of remediation of coal mining wastewater by chitosan microspheres using biomarkers. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, **51**(4):633-640.
- COLLINS, A. R. 2004. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. **Molecular Biotechnology**, **26**(3):249-261.
- COPPO, G. C. et al. 2018. Genotoxic, biochemical and bioconcentration effects of manganese on *Oreochromis niloticus* (Cichlidae). **Ecotoxicology**, **27**(8):1150-1160.

- DALZOCHIO, T. et al. 2016. The use of biomarkers to assess the health of aquatic ecosystems in Brazil: a review. **International Aquatic Research**, **8**(4):283-298.
- DEPLEDGE, M. H.; AAGAARD, A.; GYORKOST, P. 1995. assessment of trace metal toxicity using molecular, physiological and behavioural biomarkers. **Marine Pollution Bulletin**, **31**(1-3):19-27.
- EVARD, E. et al. 2012. Responses of juvenile European flounder (*Platichthys flesus*) to multistress in the Vilaine estuary, during a 6-month survey. **Environmental Science and Pollution Research**, **20**(2):676-689.
- FAIRBAIRN, D. W.; OLIVE, P. L.; O'NEILL, K. L. 1995. The comet assay: a comprehensive review. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, **339**(1):37-59.
- FATIMA, M. et al. 2014. Assessment of genotoxic induction and deterioration of fish quality in commercial species due to heavy-metal exposure in an urban reservoir. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, **67**(2):203-213.
- GARCÍA-NIETO, E. et al. 2014. Genotoxicological response of the Common Carp (*Cyprinus carpio*) exposed to spring water in Tlaxcala, México. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, **93**(4):393-398.
- GRINEVICIUS, V. M. A. S. et al. 2009. Textile effluents induce biomarkers of acute toxicity, oxidative stress, and genotoxicity. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, **57**(2):307-314.
- GUERRIERO, G.; BASSEM, S. M.; ABDEL-GAWAD, F. K. 2018. Biological responses of white sea bream (*Diplodus sargus*, Linnaeus 1758) and sardine (*Sardine pilchardus*, Walbaum 1792) exposed to heavy metal contaminated water. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, **30**(8):688-694.
- GUILHERME, S. et al. 2010. European eel (*Anguilla anguilla*) genotoxic and pro-oxidant responses following short-term exposure to Roundup-a glyphosate-based herbicide. **Mutagenesis**, **25**(5):523-530.
- _____. 2014. DNA and chromosomal damage induced in fish (*Anguilla anguilla* L.) by aminomethylphosphonic acid (AMPA)—the major environmental breakdown product of glyphosate. **Environmental Science and Pollution Research**, **21**(14):8730-8739.
- HEINEN, E. 1978. Effects of antimitotic agents either free or bound to dna on mouse peritoneal macrophages cultivated in vitro. **Virchows Arch. B Cell Path**, **27**(1):79-87.
- KARR, J. R. 1981. Assessment of biotic integrity using fish communities. **Fisheries**, **6**(6):21-27.
- KOLAREVIĆ, S. et al. 2016a. Assessment of the genotoxic potential along the Danube River by application of the comet assay on haemocytes of freshwater mussels: The Joint Danube Survey 3. **Science of the Total Environment**, **540**: 377-385.
- _____. 2016b. Evaluation of genotoxic pressure along the Sava River. **PLOS ONE**, **11**(9):1-23.
- KOPPEN, G.; VERSCHAEVE, L. 1996. The alkaline comet test on plant cells: A new genotoxicity test for DNA strand breaks in *Vicia faba* root cells. **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, **360**(3):193-200.
- KOPPEN, G. et al. 2017. The next three decades of the comet assay: a report of the 11th International Comet Assay Workshop. **Mutagenesis**, **32**(3):397-408.
- LE BIHANIC, F. et al. 2014. Developmental toxicity of PAH mixtures in fish early life stages. Part I: adverse effects in rainbow trout. **Environmental Science and Pollution Research**, **21**(24): 13720-13731.
- LE GUERNIC, A. et al. 2016. Acclimation capacity of the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*, L.) to a sudden biological stress following a polymetallic exposure. **Ecotoxicology**, **25**(8):1478-1499.
- LUNN, G.; SANSONE, E. B. 1987. Ethidium bromide: destruction and decontamination of solution. **Analytical Biochemistry**, **162**:453-458.

- MCKELVEY-MARTIN, V. J. et al. 1993. The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): A European review. **Mutation Research**, **288**(1):47-63.
- MØLLER, P. et al. 2020. Minimum Information for Reporting on the Comet Assay (MIRCA): recommendations for describing comet assay procedures and results. **Nature Protocols**, **15**(12):3817-3826.
- NAGPURE, N. S. et al. 2016. Mutagenic, genotoxic and bioaccumulative potentials of tannery effluents in freshwater fishes of River Ganga. **Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal**, **23**(1):98-111.
- NEHLS, S.; SEGNER, H. 2005. Comet assay with the fish cell line rainbow trout gonad-2 for in vitro genotoxicity testing of xenobiotics and surface waters. **Environmental Toxicology and Chemistry**, **24**(8):2078-2087.
- NERI, M. et al. 2015. Worldwide interest in the comet assay: a bibliometric study. **Mutagenesis**, **30**(1):155-163.
- NIKINMAA, M. 2014. Chapter 12 - Bioindicators and biomarkers. In: M. Nikinmaa. **An introduction to aquatic toxicology**. Cambridge: Academic Press, p. 147-155.
- OSSANA, N. A. et al. 2019. Histological, genotoxic, and biochemical effects on *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns 1842) (Cyprinodontiformes, Poeciliidae): early response bioassays to assess the impact of receiving waters. **Hindawi/ Journal of Toxicology**, **2019**:1-13.
- OSTLING, O.; JOHANSON, K. J. 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, **123**(1):291-298.
- PEREIRA, C. S. A. et al. 2010. Evaluation of DNA damage induced by environmental exposure to mercury in *Liza aurata* using the comet assay. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, **58**(1):112-122.
- RAMSDORE, W. A. et al. 2012. Handling of *Astyanax* sp. for biomonitoring in Cangüiri Farm within a fountainhead (Iraí River Environment Preservation Area) through the use of genetic biomarkers. **Environmental Monitoring and Assessment**, **184**(10):5841-5849.
- RAND, G. M.; WELLS, P. G.; MCCARTY, L. S. 1995. Introduction to aquatic toxicology. In: G. M. Rand. (Ed.). **Fundamentals of Aquatic Toxicology: effects, environmental fate and risk assessment**. Washington: Taylor & Francis, p. 3-70.
- REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS, C. J. (Eds.). 2003. **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 729p.
- RYDBERG, B.; JOHANSON, K. J. 1978. Estimation of DNA strand breaks in single mammalian cells. In: P. C. Hanawalt; E. C. Friedberg; C. F. Fox. (Eds.). **DNA repair mechanisms**. Cambridge: Academic Press, p. 465-468.
- SANTOS, R. et al. 2013. Relationship between DNA damage in sperm after ex vivo exposure and abnormal embryo development in the progeny of the three-spined stickleback. **Reproductive Toxicology**, **36**:6-11.
- SCALON, M. C. S. et al. 2013. Genotoxic potential and physicochemical parameters of Sinos River, Southern Brazil. **Hindawi/ The Scientific World Journal**, **2013**:1-6.
- SILVA, J. 2007. O uso do ensaio cometa para o ensino de genética toxicológica. **Genética na Escola**, **2**(2):30-33.
- SINGH, N. P.; STEPHENS, R. E.; SCHNEIDER, E. L. 1994. Modifications of alkaline microgel electrophoresis for sensitive detection of DNA damage. **International Journal of Radiation Biology**, **66**(1):23-28.
- SINGH, N. P. et al. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, **175**(1):184-191.
- SISINNO, C. L. S.; OLIVEIRA-FILHO, E. C. (Orgs.). 2013. **Princípios de toxicologia ambiental**. Rio de Janeiro: Interciência, 216p.
- SPEIT, G.; HARTMANN, A. 1999. The comet assay (single-cell gel test). In: D. S. Henderson. (Ed.) **DNA repair protocols**. Methods in Molecular Biology. v. 113. Totowa: Humana Press, p. 203-212.

_____. 2006. The comet assay (single-cell gel test): a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. In: D. S. Henderson. (Ed.) **DNA repair protocols**. Methods in Molecular Biology. Totowa: Humana Press, p. 275-286.

SUNJOG, K. et al. 2012. Heavy metal accumulation and the genotoxicity in Barbel (*Barbus barbus*) as indicators of the Danube River pollution. **The Scientific World Journal**, 2012:1-6.

_____. et al. 2013. Comparison of comet assay parameters for estimation of genotoxicity by sum of ranking differences. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 405(14):4879-4885.

TERNJEJ, I. et al. 2010. Estimation of DNA integrity in blood cells of Eastern Mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) inhabiting an aluminium-polluted water environment: an alkaline comet assay study. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, 59(2):182-193.

TICE, R. R. et al. 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, 35(3):206-221.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 13(2):57-149.

VICTORINO, C. J. A. 2007. **Planeta água morrendo de sede**: uma visão analítica na metodologia do uso e abuso dos recursos hídricos. Porto Alegre: EDIPUCRS, 101p.

WWAP, United Nations World Water Assessment Programme. 2018. The United Nations World Water Development Report 2018: nature-based solutions for water. Paris: UNESCO, 154p. Disponível em: <<https://unesdoc.unesco.org/ark:/48223/pf0000261424/PDF/261424eng.pdf.multi>>. Acesso em: 14 jan. 2021.

ZHOU, Q. et al. 2008. Biomonitoring: an appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. **Analytica Chimica Acta**, 606(2):135-150.