

Artigos de Revisão

TESTE DO MICRONÚCLEO: UMA TRIAGEM PARA AVALIAÇÃO GENOTÓXICA

Mônica Flores

Pós-graduanda do Curso de Especialização em Análises Clínicas do Centro Universitário de Maringá - CESUMAR; Farmacêutica. E-mail: floress_m@yahoo.com.br

Mirian Ueda Yamaguchi

Mestre em Análises Clínicas; Docente do curso de Farmácia, Habilitação em Análises Clínicas do Centro Universitário de Maringá - CESUMAR. E-mail: mirianuy@cesumar.br

RESUMO: Em âmbito mundial, tem-se encontrado forte relação entre a exposição a agentes genotóxicos e o desenvolvimento de diversos efeitos nocivos à saúde. É crescente a preocupação com o efeito mutagênico e carcinogênico de agentes genotóxicos em populações expostas ocupacionalmente, acidentalmente ou por estilo de vida, pelo fato de que a ação mutagênica por vezes se manifesta somente após muitos anos, no aumento da incidência de cânceres ou malformações congênitas, caracterizando os chamados efeitos cumulativos, o que tem contribuído para que a exposição a agentes genotóxicos seja um dos principais problemas de saúde pública. Há necessidade de testes rápidos e confiáveis que detectem os danos provocados por este tipo de exposição, como o teste do micronúcleo. Considerando a importância deste teste para a monitoração de alterações cromossômicas causadas por exposição ocupacional, esta revisão tem por objetivo caracterizar o teste do micronúcleo e demonstrar sua aplicabilidade na avaliação genotóxica e na monitoração ocupacional de organismos expostos a agentes tóxicos. Pudemos concluir que por meio desta técnica é possível detectar e identificar efeitos genotóxicos através de aberrações cromossômicas em células de organismos expostos a substâncias com potencial de mutagenicidade. Assim, os MNs atuam como marcadores biológicos de danos genéticos e podem ser utilizados como indicadores de mutagenicidade e como um instrumento de monitoração, considerando-se que retornam aos níveis basais quando o organismo permanece um período sem contato com a substância indutora.

PALAVRAS-CHAVE: Genotoxicidade; Teste do Micronúcleo; Mutações e Aberrações Cromossômicas.

MICRONUCLEUS TEST: AN EVALUATION FOR GENOTOXIC SCREENING

ABSTRACT: In the world, it has been found a strong relationship between exposure to genotoxic agents and the development of various health harmful effects. It is a growing concern about the carcinogenic and mutagenic effects of genotoxic agents in populations occupationally, accidentally or by lifestyle exposure. By the fact that the mutagenic action sometimes manifests itself only after many years in the increasing cancers incidence and congenital malformations, characterizing the so called cumulative effects, which has contributed to that exposure to genotoxic agents that is a major public health problem. There is a need for reliable and rapid tests that detect the damage caused by this type of exposure, as the micronucleus test. Considering the importance of this test for the monitoring of chromosomal changes caused by occupational exposure, this review aims to characterize the micronucleus test and demonstrate its applicability in genotoxic assessment and monitoring of occupational organisms exposed to toxic agents. It was concluded that using this technique it is possible to detect and identify genotoxic effects through chromosomal aberrations in organisms cells exposed to substances with mutagenicity

potential. Thus, the MNs act as biological markers of genetic damage and can be used as mutagenicity indicators and as a monitoring tool, considering that they return to baseline levels when the body remains a period without contact with the inducing substance.

KEYWORDS: Genotoxicity; Micronucleus Test; Mutations and Chromosome Aberrations.

INTRODUÇÃO

Em âmbito mundial, tem-se encontrado forte relação entre a exposição a agentes genotóxicos e o desenvolvimento de diversos efeitos nocivos à saúde, principalmente com a incidência de cânceres e problemas reprodutivos em pessoas ocupacionalmente expostas, em laboratórios químicos, clínicos, toxicológicos e indústrias em geral (MÁRQUES et al., 2005). Vários tipos de agentes químicos - como medicamentos, inseticidas, fungicidas, herbicidas, fertilizantes e outros produtos - têm contribuído para que este seja um dos principais problemas de saúde pública, principalmente em países pouco desenvolvidos (PAUMGARTTEN et al., 1998).

Alguns autores enfatizam a necessidade de testes rápidos e confiáveis que detectem esses danos. O Teste do Micronúcleo encontrou seu lugar em biomonitoramento, como um teste que oferece um procedimento técnico mais fácil em relação aos ensaios de aberrações cromossômicas (CAs), pois os micronúcleos (MNs) são mais fáceis de observar e contar do que as CAs, e assim esse método requer menos treinamento e perícia. Monitorar as CAs envolve distinguir entre dois tipos de dano, visto que a monitoração da formação de MNs consiste simplesmente em contar as células apropriadas (BAKER; CONNOR, 1996).

O teste do micronúcleo foi descrito pela primeira vez por Schimidt W., em 1975. É um teste realizado em mamíferos "in vivo", e detecta substâncias mutagênicas que quebram os cromossomos (substâncias clastrogênicas) ou que interferem na formação do fuso mitótico, alterando a distribuição equitativa dos cromossomos durante a divisão celular. Os micronúcleos se formam pela extrusão de cromossomos inteiros ou seus fragmentos durante a divisão celular, sendo uma porção de cromatina resultante de mitoses aberrantes (REIS et al., 2004). Localizam-se à parte, sendo adicionais ao núcleo principal da célula; não apresentam membrana que os delimite e correspondem ao que se denomina na hematologia de Corpúsculo de Howel - Jolly (JOKSIÉ; PETROVIÉ; ILIÉ, 2004).

O aspecto mais importante do Teste do Micronúcleo é que permite identificar eventual aumento na frequência de mutação em células que são expostas a uma gama variada de agentes genotóxicos, por isso é capaz de expressar os danos no cromossomo como MNs. Assim, o teste do MN é originalmente, entre os testes citogênicos, o que fornece uma medida de confiança da perda do cromossomo e da ruptura (FENECH, 1998).

Comparado com outros testes citogênicos, o teste do MN apresenta algumas vantagens, incluindo baixo custo, rapidez de análise para triagem de grande número de substâncias. É capaz de considerar e avaliar as diferentes fases da farmacocinética das drogas, avalia danos cromossômicos e possui reprodutibilidade satisfatória, já que foi adaptado por vários autores ao estudo em diferentes espécies (GARAJVRHOVAC; ZELJEZIC, 2001). Nesta circunstância, os ensaios realizados com animais em laboratório oferecem grandes

vantagens, especialmente de reproduzir as condições de exposições humanas aos agentes tóxicos.

Considerando a importância deste teste para a monitoração de alterações cromossômicas causadas por exposição ocupacional, esta revisão tem por objetivo caracterizar o teste do micronúcleo e demonstrar sua aplicabilidade na avaliação genotóxica e monitoração ocupacional de organismos expostos a agentes tóxicos.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 O TESTE DO MICRONÚCLEO

O teste do micronúcleo, sendo um teste citogenético, consiste na investigação de células previamente expostas a agentes químicos, com a finalidade de detectar possíveis aberrações cromossômicas. O teste baseia-se num aumento da frequência de eritrócitos policromáticos com micronúcleos, utilizando-se para isso, preferencialmente, células de mamíferos (medula óssea ou sangue periférico) de animais devidamente tratados.

A metodologia do teste é simples, mas para garantir sua qualidade e confiabilidade se faz necessário obedecer a requisitos preliminares, como, por exemplo, protocolos bem padronizados quanto ao tratamento dos animais, coleta e processamento das células. Desta forma, os animais utilizados no experimento devem ser, preferencialmente, camundongos jovens de quatro a cinco semanas de idade, mantidos em dieta equilibrada, recebendo alimento e água "ad libitum" e em temperatura, umidade e ciclos de luz controlados de acordo com as boas normas de biotério. Grupos de controle e experimental são distribuídos aleatoriamente, e dividem-se em: *grupo-controle negativo*, *grupo-controle positivo* (administra-se substância reconhecidamente indutora de mutagênese, por exemplo, ciclofosfamida 50mg/Kg) e *grupo-teste* (administra-se a substância que está sendo testada). Recomenda-se que cada grupo seja composto de dez animais, para que se tenha uma maior representatividade, e que estes sejam preferencialmente machos, para evitar o fator hormonal existente nas fêmeas. Os animais são tratados uma única vez com as substâncias respectivas de cada grupo, e as coletas devem ser feitas no mínimo doze e no máximo trinta horas após o tratamento, sendo necessário padronizar os horários da coleta.

Após o sacrifício, retira-se a medula óssea a partir do fêmur e centrifuga-se a 1000 rpm/5 min. O sobrenadante é descartado, e a partir do resíduo são preparados os esfregaços (duas lâminas por animal), que, depois de secados à temperatura ambiente, são corados com a técnica de coloração de Leishmann e observados ao microscópio de fluorescência. Conta-se o número de eritroblastos policromáticos (EP) com micronúcleo em relação ao total de EPs (no mínimo 1000 EPs por lâmina). Os micronúcleos podem ser visualizados usando-se diferentes técnicas, entre elas a coloração de Giemsa ou a fluorescência, e suas frequências são quantificadas microscopicamente (JOKSIÉ; PETROVIÉ; ILIÉ, 2004).

Os testes de genotoxicidade incluem diversas metodologias, e representam uma importante parte da pesquisa para avaliação da toxicidade celular para identificar o potencial carcinogênico e a mutagenicidade do produto químico e, conseqüentemente, proteger o material genético humano (RIBEIRO et al., 2004). Em geral os estudos são realizados em diversos níveis, de acordo com o sistema experimental que se utiliza. O primeiro nível engloba ensaios moleculares e em bactérias (mutação em gene bacteriano); o segundo se constitui de provas *in vitro* em células de cultivo (aberrações cromossômicas); o terceiro compreende análises *in vivo* (mutação gênica em células de mamíferos); e o último nível corresponde a estudos em populações expostas (CARBALLO et al., 2001). No entanto, outras técnicas também podem ser aplicadas, incluindo-se: o coeficiente DNA/proteína, atividade das enzimas mitocondriais, proliferação celular, índices mitóticos, identificação de danos, quebras e reparos no DNA, aberrações cromossômicas, não disjunções e, mais recentemente, a detecção de apoptose e necrose (VANHAUWAERT; VANPARYS; VOLDERS, 2001). Utiliza-se ainda, com bastante freqüência, o Teste Cometa, que consiste na análise direta das células de sangue total quanto à freqüência de danos ao DNA quando seus fragmentos migram do núcleo da célula (GARAJVRHOVAC; ZELJEZIC, 2002).

2.2 APLICABILIDADE DO TESTE

O teste do micronúcleo tem sido aplicado extensivamente em testes de genotoxicidade de produtos químicos, pois os micronúcleos são facilmente visualizados nos eritrócitos e são fortes indicativos para mensuração de aberrações cromossômicas (CAMPANA et al., 2003). Na legislação da União Européia, é o teste de escolha "in vivo", usando células da medula óssea de roedores (VANHAUWAERT; VANPARYS; VOLDERS, 2001). É utilizado como teste de "screening" nos estágios iniciais de desenvolvimento de drogas por indústrias farmacêuticas, com a finalidade de identificar substâncias que apresentaram resultados positivos em ensaios de aberrações cromossômicas *in vitro* (PHELPS; GARRIOTT; HOFFMAN, 2002). Vanhauwaert, Vanparys e Volders (2001) relatam em seu estudo que o teste do micronúcleo apresentou sensibilidade satisfatória em situação de exposição a substâncias conhecidamente clastrogênicas, quando administradas via oral por gavagem, dentre elas: colchicina, Carbendazina, Tubolazole, griseofulvina e 1,2 dimetilhidrazina. O teste do micronúcleo, ao lado da análise de aberrações cromossômicas e do teste Cometa, é considerado padrão ouro nos métodos citogenéticos.

2.3 MONITORAÇÃO OCUPACIONAL

A exposição do ser humano e do ambiente às mais diversas substâncias químicas propicia a ocorrência de efeitos deletérios que estas podem causar, os quais podem variar de danos no ecossistema a efeitos tóxicos à saúde (neurotoxicidade; efeitos carcinogênicos, mutagênicos e teratogênicos). A relação entre tóxicos e DNA deu origem à Genética Toxicológica como ciência, uma vez que foram reconhecidos a importância da mutagênese como passo prévio para a carcinogenicidade e os perigos potenciais dos agentes mutagênicos para a população humana e a biosfera. É crescente a preocupação com o efeito mutagênico e carcinogênico de agentes genotóxicos em populações expostas ocupacionalmente, acidentalmente ou por estilo

de vida, pela possibilidade de que a ação mutagênica venha a manifestar-se somente após muitos anos, no aumento da incidência de cânceres ou malformações congênitas, caracterizando os chamados efeitos cumulativos. Além disso, a ocorrência de doenças relacionadas ao ambiente de trabalho é sub-registrada, o que denota a importância da realização de anamnese ocupacional como medida capaz de auxiliar na superação dessa distorção (MARTINS, 2002). Fomenta-se a padronização de ferramentas metodológicas que permitam quantificar os danos produzidos pela exposição e sua implementação em programas de monitoração voltados à saúde ocupacional (MÁRQUES, 2005). Um número crescente de países tem procurado estabelecer "limites de tolerância" em relação à exposição a agentes danosos, segundo as recomendações internacionais da Organização Internacional do Trabalho (OIT) e a Comissão Permanente e Associação Internacional de Saúde Ocupacional, compilando dados publicados em países como os Estados Unidos da América, a Alemanha e a França (OMS, 2003).

Um estudo realizado por Garaj-Vrhovac e Zeljezic (2002) mostrou que, após um período de oito meses sem a exposição aos produtos, a freqüência de micronúcleos e aberrações cromossômicas sofreu um decréscimo em relação aos grupos recentemente expostos. Estes fatos comprovaram a eficácia do teste, demonstrando a possibilidade de danos genômicos em células somáticas humanas, bem como uma provável monitoração destes organismos (JOKSIĆ; PETROVIĆ; ILIĆ, 2004). Desta forma, considera-se que os MNs atuam como marcadores biológicos de danos genéticos e podem ser utilizados como indicadores de mutagenicidade e como um instrumento de monitoração, considerando-se que retornam aos níveis basais quando o organismo permanece durante certo período sem contato com a substância indutora.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em princípio, seria de fundamental importância a avaliação do potencial genotóxico de substâncias químicas, incluindo substâncias recém-sintetizadas suspeitas de mutagenicidade. Para isso existem diversas metodologias adequadamente padronizadas, que podem ser e são aplicadas com o objetivo de classificar as substâncias quanto ao seu grau de toxicidade. Dentre todas estas técnicas, o teste do micronúcleo destaca-se por apresentar algumas vantagens em relação aos demais. Sua simplicidade o torna bastante atrativo, uma vez que grande número de células pode ser analisado. De acordo com relatos de vários autores, por meio desta técnica é possível detectar e identificar efeitos genotóxicos através de aberrações cromossômicas em células de organismos expostos a substâncias com potencial de mutagenicidade, inclusive radiações ionizantes, uma vez que os micronúcleos se encontram significativamente aumentados, quando comparados com grupos-controle. Assim, atuam como marcadores biológicos de danos genéticos e podem ser utilizados como indicadores de mutagenicidade e como um instrumento de monitoração, considerando-se que retornam aos níveis basais quando o organismo permanece durante certo período sem contato com a substância indutora.

REFERÊNCIAS

BAKER, E. S.; CONNOR, T. H. Monitoring occupational exposure to cancer chemotherapy drugs. *Am J Health Pharm*, v. 53, n. 22, p. 2713-2723, 1996.

- CAMPANA, M. A. et al. Micronuclei induction in *Rana Catesbeiana* tadpoles by the Pyrethroid insecticide lambda-Cyhalothrin. **Genetics and Molecular Biology**, v. 26, n. 1, p. 99-103, 2003.
- CARBALHO, A. M. et al. Mutagenicidade química Y evaluación de dano potencial mediante ensayos de corto plazo. **Acta toxicol. Agent**, v. 9, n. 1, p. 4-8, 2001.
- FENECH, M. Important variables that influence base-line micronucleus frequency in cytokinesis-blocked lymphocytes-a biomarker for DNA damage in human populations. **Mutat Res.**, v. 404, p. 155-165, 1998.
- GARAJVRHOVAC, V.; ZELJEZIC, D. Assessment of genome damage in a population of Croatian workers employed in pesticide production by chromosomal aberration analysis, micronucleus assay and Comet assay. **J Appl Toxicol.**, v. 22, p. 255, 2002.
- JOKSIÉ, G.; PETROVIÉ, S.; ILIÉ, Z. Age - related changes in radiation-induced micronuclei among healthy adults. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, p. 1111-1117, 2004.
- MÁRQUEZ, M. E. F. et al. Detección Del dano genotoxico agudo y crónico en umna población de laboratoristas ocupacionalmente expuestos. **Latreia**, v. 18, n. 1, p. 275-282, 2005.
- MARTINS, D. I. Exposição ocupacional a solventes orgânicos em trabalhadores de laboratórios e efeitos genotóxicos. Tese (Doutorado). Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo, 2002.
- PAUMGARTTEN, E. J. R. et al. Levels of organochlorine pesticides i the blood serum of agricultural workers from Rio de Janeiro state, Brazil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 14, n. 3, 1998.
- PHELPS, J. B.; GARRIOTT, M. L.; HOFFMAN, W. P. A protocol for the micronucleus test II. Contributions for the validation of a protocol suitable for regulatory submission s from a examination of 10 chemicals with differents mechanisms of action and different levels of activity. **Mutation Research**, v. 521, p. 103-112, 2002.
- REIS, S. R. A. et al. Avaliação da presença de micronúcleos em células esfoliadas da língua de indivíduos dependentes químicos de etanol através dos métodos de Feulgen e Papanicolau. **Revista Odonto Ciência**, v. 19, n. 46, p. 367-371, 2004.
- RIBEIRO, D. A. et al. Fluoride does not induce DNA breakage in chinese hamster ovary cells in vitro. **Rev. Bras. Oral**, v. 18, p. 192-196, 2004.
- VANHAUWAERT, A; VANPARYS, P.; VOLDERS, M. K. The *in vivo* gut micronucleus test detects clastrogens and aneugens given by gavage. **Mutagenesis**, v. 16, p. 39-50, 2001.