

Ensaio cometa e teste micronúcleo como ferramentas de monitoramento de genotoxicidade na terapia da leucemia linfoblástica aguda: uma revisão da literatura

Natalia Araújo da Silva^{1*}

Jeanne Cristina Lapenda Lins Cantalice^{2**}

RESUMO

A leucemia é um tipo de câncer que acomete os glóbulos brancos, sendo a sua origem, na maioria das vezes desconhecida, é a neoplasia maligna mais comum em crianças. Ela tem como determinante a aglomeração de células jovens blásticas, incomuns na medula óssea, que substituem as células sanguíneas naturais. Seu pico de ocorrência é entre 2 e 5 anos de idade, equivalente a 25% de todos os cânceres em crianças nessa faixa etária. O objetivo deste trabalho foi realizar uma atualização sobre a importância da aplicação dos testes cometa e teste micronúcleo como ferramenta clínica no monitoramento dos efeitos genotóxicos em pacientes em tratamento oncológico. Sabe-se que tais efeitos em nível celular propiciam a eventos mutacionais e, tais eventos induzem ao aparecimento do câncer. Uma vez que o tratamento é celular inespecífico, é de fundamental relevância este monitoramento. Realizou-se uma revisão bibliográfica onde foram utilizadas bases de dados da Scielo e o MEDLINE, a amostra final foi constituída por 9 artigos. Segundo os dados, a ausência de padronização do Ensaio Cometa e do Teste do Micronúcleo *in vitro* entre os laboratórios quando usadas às linhagens celulares de leucemia e linfoma, não sendo possível tal monitoramento. Sugere-se, em estudos futuros, a aplicação a padronização destes testes para cada tipo de linhagem celular neoplásica.

Palavras-chave: Ensaio Cometa. Teste do Micronúcleo. Padronização. Leucemia Linfoblástica Aguda.

ABSTRACT

Leukemia is a type of cancer that affects the white blood cells, and its origin, most of the time unknown, is the most common malignant neoplasm in children. It has as its determinant the agglomeration of young, blastic, uncommon cells in the bone marrow, which replace natural blood cells. Its peak of occurrence is between 2 and 5 years of age, equivalent to 25% of all cancers in children in this age group. The objective of this work was to perform an update on the importance of the application of comet and micronucleus test as a clinical tool in the monitoring of genotoxic effects in patients under cancer treatment. It is known that such effects at the cellular level propitiate mutational events and, such events induce the onset of cancer. Since the treatment is non-specific, this monitoring is of fundamental importance. A bibliographic review was performed using Scielo and MEDLINE databases, and the final sample consisted of 9 articles. According to the data, the absence of standardization of the Comet Assay and the Micronucleus Test *in vitro* between the laboratories when used to the leukemia and lymphoma cell lines, being not possible such monitoring. It is suggested, in future studies, the application to the standardization of these tests for each type of neoplastic cell line.

Keywords: Comet Assay. Micronucleus Testing. Standardization. Acute Lymphoblastic Leukemia.

^{1*} Graduanda do 10º Período do curso de Farmácia UNIFAVIP-WYDEN. Email: nathi_nicoli@hotmail.com

^{2**} Professora Dra de Ciências Biológica: Jeanne Cristina Lapenda Lins Cantalice, Email: jeanne.lins@unifavip.edu.br. Fone: 55(81) 98859 4299.

INTRODUÇÃO

O câncer é o termo empregado para se referir a um grupo correspondente a 100 doenças que se caracteriza pelo crescimento desordenado de células, que invadem tecidos e órgãos. Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores, que podem espalhar-se para outras regiões do corpo (Inca, 2019).

Na atualidade, há entendimento quanto ao fato de que a mortalidade por câncer não se deve apenas a fatores biológicos, porém bem como às condições de vida, à competência do sistema de saúde, aos costumes e tipos culturais próprios das diversas sociedades (Teixeira et al., 2012).

De acordo com a organização mundial da saúde (OMS), no ano de 2030 estima-se 75 milhões de indivíduos vivos com câncer, correspondendo 21 milhões de novos casos da patologia e 13 milhões de óbitos no mundo todo, exceto a neoplasia do tipo melanoma. Nos dias atuais a hipótese é de 14 milhões de novas ocorrências de 8 milhões de morte por câncer.

No ranking mundial, entre os cânceres mais sucedidos, as leucemias dominam a décima primeira colocação, sendo a décima morte por câncer (Moraes, 2017).

Segundo o INCA (2019), as leucemias podem ser divididas em: leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crônica, leucemia linfoblástica crônica e a leucemia linfoblástica aguda (LLA) sendo este o tipo mais comum em crianças principalmente durante a fase dos 2 a 5 anos de idade, fato que demonstra a necessidade de investigação.

É evidente os avanços na terapia da leucemia Linfoblástica Aguda na infância. O desenvolvimento terapêutico conquistado na intervenção de crianças com leucemia linfóide aguda (LLA) nos últimos 50 anos resultou em taxas de cura em torno de 80%, atingiu um aumento marcante no número de pessoas vivas (Molinari et al., 2017).

No público infantil, estima-se uma ocorrência por ano de 200 mil novos casos de câncer em todo o mundo. No Brasil, de 10-15 novos casos de câncer menor de 15 anos, 4 são LLA (27% a 40%). Tal leucemia pode alcançar adultos jovens, como crianças, sendo o câncer infantil mais constante com pico de existência entre os 2 e 5 anos de idade (Dantas et al., 2015).

O tratamento da leucemia linfoblástica aguda pediátrica (LLA) consiste na concepção de adequar a veemência da terapia ao perigo de recidiva do paciente. O diagnóstico da Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) se sujeita do reconhecimento e distinção de blastos em sangue periférico ou medula óssea. Porém diferenciar blastos de linfócitos ativados é dificultoso em alguns pacientes (Albitar; Giles; Kantarjian, 2008).

Os avanços no tratamento da LLA obtiveram evoluções na sobrevida. Os quatro essenciais constituintes da terapia são a indução da remissão, a consolidação, a manutenção e a terapia dirigida pelo sistema nervoso central, e em geral permanecem de 2 a 3 anos. A força do recurso terapêutico embasada na estratificação baseada no risco é à base do tratamento. Pacientes com traços de doença mais convenientes são poupados dos resultados mais tóxicos da quimioterapia, enquanto procedimentos mais destrutivos são conservados para aqueles com doença de alto risco.

O prognóstico da LLA pediátrica recidivada depende principalmente da duração da remissão e do local da recidiva (Cooper; Brown, 2015).

Ainda que seja perceptível a melhora da Leucemia Linfoblástica aguda nos últimos 40 anos, dados recentes indicam que a terapia referência falha em 10 a 20 % dos pacientes diagnosticados recentemente e, dada sua incidência a, LLA permanece sendo a causa primordial de mortalidade referente ao câncer com menos de 19 anos. A sobrevida de crianças com LLA recidivante é pobre, alcançando somente 15% naquelas com recidiva imatura da medula óssea (Hoffman; Gore, 2014).

Procedimentos metodológicos

Para a elaboração da presente revisão da literatura, as seguintes etapas foram percorridas: estabelecimento da hipótese (os testes de micronúcleo e ensaio cometa podem ser usados no monitoramento dos efeitos genotóxicos de pacientes em exposição às terapias antineoplásicas?); objetivos da revisão (promover uma atualização na temática); estabelecimento de critérios de inclusão e exclusão de artigos (seleção da amostra); definição das informações a serem extraídas dos artigos selecionados; análise dos resultados e discussão e apresentação dos resultados (tabela 1). Para guiar a revisão, formulou-se a seguinte questão: No tratamento das leucemias linfoblásticas aguda os fármacos quimioterápicos atuam de forma inespecífica resultando em danos genômicos tanto as células cancerígenas quanto as normais, representando um risco considerado para indução de novos eventos mutacionais? Sabe-se que as mutações representam as principais causas da oncogênese.

Para a seleção dos artigos foram utilizadas 2 bases de dados, a saber: ScieLo (*Scientific Electronic Library Online*) e o MEDLINE (*Medical Literature Analysis and Retrieval System on-line*). Os critérios de inclusão dos artigos definidos, inicialmente, para a presente revisão foram: 1) artigos publicados em português, inglês e espanhol, com os resumos disponíveis nas bases de dados selecionadas, no período compreendido entre 2009 - 2019; 2) artigos publicados cuja metodologia adotada permitissem obter evidências fortes, ou

seja, revisões sistemáticas de múltiplos ensaios clínicos randomizados controlados, ensaios clínicos randomizados controlados individuais, ou estudos com delineamento de pesquisa quase- experimental.

As palavras-chave utilizadas foram ensaio cometa, teste do micronúcleo, padronização, leucemia linfoblástica aguda. A busca foi realizada pelo acesso on-line.

Para a análise e posterior seleção dos artigos que atenderam aos critérios de inclusão foi utilizado um quadro sinóptico especialmente construído para esse fim, que contemplou os seguintes aspectos, considerados pertinentes: ano (de 2009 até o ano vigente), título do artigo, autores, tipo de intervenção, resultados e conclusão. Por meio de uma revisão bibliográfica, foram encontrados os artigos de interesse e percorrido sobre os resultados e conclusão dos mesmos. A apresentação dos resultados e discussão dos dados obtidos foi feita de forma descritiva, possibilitando ao leitor a avaliação da aplicabilidade da revisão elaborada, de forma a atingir o objetivo desse método, ou seja, impactar positivamente na discussão sobre os riscos dos efeitos genotóxicos oriundo das drogas antineoplásicas em células normais de pacientes em tratamento.

UTILIZAÇÃO DO TESTE COMETA E MICRONÚCLEO PARA AVALIAÇÃO DE DANOS CELULARES

Os cromossomos são bastante usados nos estudos citogenéticos clássicos, e geralmente, são aplicados na observação e quantificação de mutações no decorrer das divisões celulares. Mesmo que o uso da citogenética incida em resultados precisos, a complexidade do trabalho a ser feito e a dificuldade ocasionada pela existência de mecanismos tem motivado o aparecimento de técnicas mais simples para apresentar e quantificar danos cromossômicos. Dentre os mecanismos alternativos que geralmente são usados, encontra-se o Teste de Micronúcleo e o Ensaio Cometa Alcalino (Van der oost et al., 2016)

O ensaio cometa tem sido amplamente utilizado como teste de monitoramento de genotoxicidade para detectar dano primário ao DNA em células individuais. O micronúcleo (MN) é também um ensaio bem estabelecido para detectar clastogenicidade e aneugenicidade. Uma combinação do teste cometa e o teste micronúcleo são capazes de detectar uma variedade de potenciais genotóxicos como um sistema de triagem in vitro. (kimura et al., 2013)

O ensaio de eletroforese em gel de célula exclusiva, também conhecido como ensaio cometa, foi criado por Ostling e Johanson e sua metodologia foi posteriormente otimizada por Singh et al e Olive e Banath. Como o ensaio cometa é um teste rápido, simples, barato e

sensível para localizar o potencial genotóxico, que tem sido usado em toxicologia genética, biologia de radiação e estudos médicos e ambientais, é um ensaio promissor de genotoxicidade *in vitro* e *in vivo* (kimura et al., 2013).

Viabiliza designar especialmente estragos iniciais razoáveis, ainda reparáveis, do DNA e pode ser usado virtualmente em qualquer célula eucariótica. Com interesse de alcançar numerosos propósitos, discrepantes modificações do ensaio cometa foram desenvolvidas. Em sua versão alcalina, que é usada principalmente, quebras de fita simples de DNA, quebras de fita dupla de DNA, locais lábeis em álcalis e quebras de fita simples associadas a locais de reparo de excisão incompletos causam aumento na migração de DNA. (Tabela 1) (Hovhannisyán, 2010).

Segundo Gisele et al., (2013), uma diferença significativa foi observada no número de micronúcleos entre o grupo ciclofosfamida e todos os grupos com anestésicos locais ($p = 0.0001$), mas não sendo observado entre o grupo controle negativo e os grupos com anestésico locais ($p = 0.05$). Este estudo a partir do monitoramento, pelos testes de micronúcleo, das terapias neoplásicas convencionais e análises comparativas entre as drogas antineoplásicas (ciclofosfamidas) e outras como anestésicos, por exemplo, demonstraram que há aumento significativo da frequência de micronúcleos, logo indicando que há risco de mutações as células normais em exposição durante a terapia (Tabela 1).

Em corroboração, Valente et al., (2017), em estudo, após ter avaliado as técnicas de biomonitoramento de genotoxicidade decorrente de risco ocupacional, como o teste de micronúcleo e ensaio cometa, aponta que foi possível mensurar possíveis estresses oxidativos celular, aberrações cromossômicas. Em adicional, afirma que os bioindicadores de genotoxicidade e técnicas de expressão gênicas são úteis na deleção de dano precoce desta exposição ocupacional e devem ser avaliados em conjuntos.

Tabela 1. Apresentação de síntese de artigos inclusos na revisão.

Ano/ Nome do artigo	Autores	Tipo de intervenção	Resultados	Conclusões
2013/ Avaliação da genotoxicidade induzida pela administração repetida de anestésicos locais.	Gisele Alborghetti Nai et al.	Teste cometa e micronúcleo	Uma diferença significativa foi observada no número de micronúcleos entre o grupo ciclofosfamida e todos os grupos com anestésicos locais ($p = 0,0001$), mas não entre o grupo controle negativo e os grupos com anestésicos locais ($p > 0,05$).	Nenhum efeito de genotoxicidade foi observado após a exposição repetida a qualquer um dos anestésicos locais avaliados.
2016/ Avaliação da mutagênese e genotoxicidade em <i>Eigenmannia virescens</i> .	Bücker, Carvalho e Alvez	Teste cometa e micronúcleo	No Teste do Micronúcleo não foi possível detectar efeitos mutagênicos significativos nos eritrócitos analisados. No entanto, para o Ensaio do Cometa os resultados sugerem ação genotóxica do benzeno	Estes resultados sugerem maior sensibilidade do Ensaio do Cometa que o Teste do MN
2015/ Testes de avaliação de genotoxicidade	Thayzi O. Zeni	Teste cometa e micronúcleo	Inúmeros testes pilotos foram realizados e permitiram, efetivamente, a padronização da metodologia.	A implantação da referida metodologia abrirá perspectivas favoráveis para a sua utilização na avaliação do potencial mutagênico de outros fatores antrópicos.
2017/ Utilização de biomarcadores de genotoxicidade e expressão gênica na avaliação de trabalhadores de postos de combustíveis expostos a vapores de gasolina.	Valente et al.	Teste cometa e micronúcleo	as técnicas identificadas foram: ensaio cometa, estresse oxidativo, micronúcleos, aberrações cromossômicas, polimorfismos, adutos de DNA e proteínas, fatores epigenéticos e expressão gênica.	Os bioindicadores de genotoxicidade e as técnicas de expressão gênica são úteis na detecção de dano precoce desta exposição ocupacional e devem ser avaliados em conjunto.

2009/ Análise da toxicidade e da genotoxicidade de agrotóxicos	Rosangela Angelise Krüger	Teste cometa e micronúcleo	A deltametrina apresentou alta toxicidade, inibindo a proliferação 26 MURIAÉ/BH - MG celular em <i>Allium cepa</i> .	A Ivermectina não apresentou capacidade tóxica, porém apresentou característica genotóxica e presença de células anaplásicas.
2014/ Avaliação da toxicidade e da genotoxicidade da ivermectina e da deltametrina através de bioensaio	Thaís Celles Moreira	Teste cometa e micronúcleo	demonstrou a capacidade dos agrotóxicos em causar alterações genéticas em agricultores expostos a tais substâncias, podendo levar ao câncer de medula óssea.	demonstrou a capacidade dos agrotóxicos em causar alterações genéticas em agricultores expostos a tais substâncias, podendo levar ao câncer de medula óssea.
2013/ Avaliação da citotoxicidade, da genotoxicidade e da potencial atividade antiviral da violaceína	Carla Regina Andrighetti Fröhner	Teste cometa e micronúcleo	Quando comparados ao controle negativo (teste t-Student $p > 0,05$); entretanto, apresentou ação genotóxica para as células VERO e FRhK-4, na concentração de 1,5 mM, quando comparada com o controle negativo.	As porcentagens de inibição da replicação dos diferentes vírus pela violaceína, obtidas através do ensaio do MTT.
2015/ Testes mutagênicos e carcinogênicos e sua respectiva importância em vigilância sanitária.	Helena Pereira da Silva Zamith	Teste cometa e micronúcleo	foi implantada a técnica, objetivo do trabalho, com a observação de núcleos de leucócitos, provenientes de sangue humano	A técnica mostrou-se adequada para a análise proposta, possibilitando a sua utilização como roteiro de aulas práticas em cursos de graduação relacionados à área da saúde.
2017/ O Ensaio Cometa na Avaliação da Genotoxicidade Induzida por Poluentes Atmosféricos	J. da Silva et al.	Teste cometa e micronúcleo	Os resultados mostraram que as células pulmonares são mais sensíveis que as células da hemolinfa. Quanto maior o tempo de exposição, mais danos ao DNA eram causados	O organismo e o método utilizado mostraram-se baratos, efetivos e sensíveis no estudo envolvendo biomonitoramento de organismos expostos aos diversos poluentes atmosféricos

O ensaio cometa (eletroforese em gel de célula única) é agora o método mais popular para medir baixos níveis de danos no DNA celular. As células são incorporadas em agarose em uma lâmina de microscópio e lisadas para produzir nucleóides de DNA super enrolado ligado à matriz nuclear. Quebras no DNA relaxam o super enrolamento e permitem que os laços de DNA se expandam, e na eletroforese se movem em direção ao ânodo, dando a aparência de uma cauda de cometa. A porcentagem de DNA na cauda reflete a frequência de quebra. A digestão do DNA nucleóide com endonucleases específicas da lesão amplia a utilidade do método para investigar diferentes tipos de danos. O reparo do DNA pode ser estudado tratando células com um agente genotóxico, incubando-as e usando o ensaio cometa para acompanhar a remoção do dano. Uma característica importante do ensaio é que o dano é detectado no nível das células individuais (Shaposhnikov; Frengen; Collins, 2009).

Ainda, de acordo com Carvalho e Alvez, (2016), ao realizarem estudo empregando o teste de micronúcleo e ensaio cometa puderam observar que a partir da aplicação do teste de micronúcleo não foi possível detectar efeitos mutagênicos significativos nos eritrócitos analisados. No entanto, para o ensaio cometa os resultados sugeriram a ação genotóxica do benzeno (Tabela 1).

O teste Micronúcleo consiste numa massa de cromatina originada de partículas cromossômicas ou de cromossomos inteiros, que se dispersão no decorrer da divisão celular, originada das ações clastogênicos, ou seja, quebra de cromossomos, ou dos aneugênicos, que direcionam a aneuploidia ou a segregação cromossômica anormal (Tice., 2013).

O teste do micronúcleo está incorporado na bateria de teste de genotoxicidade, por muito tempo em muitas classes de produtos químicos farmacêuticos, produtos químicos agrícolas, aditivos alimentares (Hayashi, 2016).

O micronúcleo é um dos procedimentos favoritos para qualificar danos no DNA no nível dos cromossomos. Ele possibilita medir a perda de cromossomos e a quebra de cromossomos. A análise da metáfase permite a análise mais detalhada de aberrações cromossômicas numéricas e estruturais, contudo, é muito demorada e precisa de profissionais altamente qualificados. O ensaio MN foi desenvolvido como um teste de rastreio de curto prazo mais simples e agora é aceito como possibilidade válida para o ensaio de aberração cromossômica. Nesse método, as aberrações cromossômicas são detectadas indiretamente por perda de cromatina do núcleo, portando o MN no citoplasma da célula. MN são expressos apenas em células em divisão (Hayashi, 2016).

O teste de micronúcleo transformou-se um dos procedimentos mais empregados em testes de genotoxicidade e populações biomonitoradas em risco. Este teste foi proposto para o acompanhamento na elaboração de produtos e testes de novas drogas (Hovhannisyán, 2010).

A principal inconveniência dessa metodologia é que o mesmo só é usado em células eucarióticas em divisão, não demonstra resultados satisfatórios em populações de células que não estejam em divisão ou nas quais a particularidade da divisão celular não seja familiar (Fenech, 2010).

Para quaisquer finalidades os resultados do teste de micronúcleo necessitam ser confiáveis e precisos. A experimentação deve ser executada com cautela por pessoas habilitadas e capazes, e desta maneira os satisfatórios resultados fidedignos serão alcançados. (Hayashi, 2016).

Kruger et al., (2009), demonstrou por meio do teste de micronúcleo que a deltametrina apresentou alta toxicidade, inibindo a proliferação celular em *allium cepa*. Afirma que a ivermectina não apresentou capacidade tóxica, porém apresentou características genotóxicas e presença de células anaplásicas. Demonstrou ainda, a capacidade dos agrotóxicos em causar alterações genéticas em agricultores expostos a tais substâncias, podendo levar ao câncer de medula óssea. Por meio destes dados, Kruger demonstrou o potencial de sensibilidade do teste de micronúcleo em detectar possíveis alterações iniciais e intrínsecas ao DNA celular ressaltando a relevância do emprego deste teste como uma ferramenta padrão no monitoramento da genotoxicidade celular (Tabela 1).

DIFICULDADES NA PADRONIZAÇÃO DE TESTES COMETAS E MICRONÚCLEO PARA SUA APLICAÇÃO NO ESTUDO DAS LEUCEMIAS.

O Ensaio Cometa e o Teste do Micronúcleo auxiliam na prevenção e a melhora da terapia do câncer quando usados no estudo da carcinogênese e na confecção de novos medicamentos antineoplásicos de maior capacidade e seletivos, podendo usar inúmeras linhagens de leucemias e linfomas, sendo a padronização de ambos os testes de suma relevância para assegurar resultados satisfatórios e seguros e ao observar a importância do Ensaio Cometa e do Teste do Micronúcleo *in vitro* no estudo da carcinogênese através de linhagens celulares de leucemias e linfomas, além das divergências e convergências entre os protocolos usados nessas pesquisas considerando as dificuldades presentes na padronização destas técnicas por estudos (Zeni, 2015).

Através da revisão bibliográfica, (Tabela 1) levantaram-se artigos sobre a temática com ano de publicação entre 2009 até o vigente ano e constatou-se que: Boa parte dos estudos

utilizou o Ensaio Cometa in vitro em meio alcalino sozinho, seguido do Ensaio Cometa in vitro em meio alcalino associado com o Teste do Micronúcleo/Teste do CBMN in vitro (Valente et al, 2017) , com menor uso do Teste do Micronúcleo/Teste do CBMN in vitro sozinho para as linhagens celulares de leucemias e linfomas (Moreira, 2014).

As linhagens mais usadas pelos artigos coletados foram a L5178Y de linfoma de rato, a HL-60 de leucemia promielocítica humana, a K562 de leucemia mieloide aguda e a Jurkat T de leucemia de células T humana para o Ensaio Cometa in vitro e as linhagens L5178Y e HL-60 para o Teste do Micronúcleo/ Teste do CBMN in vitro, as demais linhagens foi usado uma única vez (Fröhner, 2013).

O Ensaio Cometa e Teste do CBMN/Teste do Micronúcleo in vitro com linhagens celulares de leucemia e linfoma são bastante usados na investigação da genotoxicidade e da mutagenicidade de novos medicamentos (especialmente o estudo de seu potencial antineoplásico) e substâncias químicas para fins comerciais, na análise do desenvolvimento pelos quais esses medicamentos agem nas células malignas e mais escassas nos processos que abrangem a mutação das células malignas e na padronização do Teste do Micronúcleo in vitro sem o bloqueio da citocinese (Silva et al, 2017)

Mesmo que o Teste do CBMN in vitro possibilite inúmeros benefícios além da identificação da elevação da frequência dos micronúcleos em células binucleadas, o Teste do Micronúcleo in vitro pode ser reprodutível e seguro se usado com linhagens celulares estáveis e de ciclos de divisão bem determinados, como a L5178Y. Os artigos analisados defenderam o uso deste teste sem o bloqueio apresentando a sua função para identificar a elevação da frequência dos micronúcleos em células mononucleadas, com o argumento de atender melhor ao sistema encontrado in vivo (Gisele et al, 2013)

A comparação dos protocolos usados nos artigos é possível observar a diferença em compará-los entre os artigos que fazem uso da mesma linhagem celular no Ensaio Cometa e no Teste do Micronúcleo/CBMN in vitro, mesmo com os esforços inversão nas suas padronizações para testes toxicológicos. As divergências identificadas entre os protocolos para a mesma linhagem celular dificultam a padronização em laboratório, sabendo que diversas variáveis devem ser levadas em consideração quando há erro no alcance de resultados seguros. A padronização dependerá de testes contínuos através do mecanismo “erro e acerto” dos inúmeros protocolos que existem, resultando em custos desnecessários de materiais (Zamith, 2015).

Zamith et al., (2015), aponta a relevância do teste de micronúcleo como uma metodologia padrão para as aulas práticas no curso de graduação relacionados a área da saúde.

A pesquisadora implantou a técnica cujo objetivo foi analisar núcleos de linfócitos provenientes de sangue humano, identificando a frequência de normalidade, bem como os casos de patologias e morfologias irregulares como aberrações cromossômicas e micronúcleos. A técnica mostrou-se adequada para a análise proposta, visto que possibilitou a sua utilização como roteiro de aulas práticas em cursos de graduação relacionados a área da saúde. Contudo, ainda não existe uma padronização destes testes para fins de monitoramento genotóxicos das terapias antineoplásicas convencionais.

Sendo assim, a revisão bibliográfica apontou a falta de padronização do Ensaio Cometa e do Teste do Micronúcleo/Teste do CBMN in vitro entre os laboratórios quando usadas às linhagens celulares de leucemia e linfoma, recomendando-se a utilização de protocolos mais detalhados para todos os testes e a padronização destes para cada tipo de linhagem celular.

CONCLUSÃO

De acordo com este estudo, o teste cometa e micronúcleo representa um dos biomarcadores mais empregados para o monitoramento de efeitos genotóxicos de diversas substâncias como produtos naturais, extratos e óleos vegetais, até mesmo substâncias sintéticas como os fármacos antitumorais.

O estudo aponta que alguns fármacos convencionais empregados nas terapias antitumorais, apesar do seu potencial e indiscutível efeito citotóxico frente as células tumorais, poderá causar efeitos genotóxicos as células normais em exposição a depender do tratamento, principalmente na intervenção quimioterápica, uma vez que a administração sistêmica leva as células de defesa do corpo humano a exposição desta droga, induzindo assim aos danos genômicos.

Em adicional, o presente estudo apresenta a falta de padronização do Ensaio Cometa e do Teste do Micronúcleo/Teste do CBMN in vitro entre os laboratórios quando usadas às linhagens celulares de leucemia e linfoma, recomendando-se a utilização de protocolos mais detalhados para todos os testes e a padronização destes para cada tipo de linhagem celular.

É notória a escassez de publicações científicas que tragam discussões acerca dos efeitos genotóxicos dos fármacos antitumorais, mesmo tendo sido já demonstrado por poucos pesquisadores tais efeitos.

O potencial contributivo deste estudo é evidente, uma vez que promoveram uma maior atualização e discussão sobre o tema em questão, Ensaio Cometa e teste micronúcleo como ferramentas de monitoramento de genotoxicidade na terapia da LLA. Há uma necessidade de

que sejam realizados mais estudos clínicos que mensurem melhor esses riscos genotóxicos de fármacos aplicados nas terapias antitumorais, a fim de minimizar a exposição às células saudáveis, direcionando o alvo de ação da droga e diminuindo, sobretudo, o risco de mutação e indução de um novo tumor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

Albitar, maher; giles, francis j.; kantarjian, hagop. diagnosis of acute lymphoblastic leukemia. acute leukemias, [s.l.], p.119-130, 2008

Bucker, Augusto; carvalho, wanderson and alves-gomes, José Antonio. avaliação da mutagênese e genotoxicidade em *eigenmannia virescens* (teleostei: gymnotiformes) expostos ao benzeno. 2016. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=s0044-59672006000300011&script=sci_abstract&tlng=pt

Cooper, stacy l.; brown, patrick a.. treatment of pediatric acute lymphoblastic leukemia. pediatric clinics of north america, [s.l.], v. 62, n. 1, p.61-73, fev. 2015.

Dantas, Giselly Karitta Santana et al. Diagnóstico diferencial da leucemia linfóide aguda. Em Pacientes Infanto-juvenis, Goiânia, v. 13, n. 2, p.3-18, out. 2015.

Fenech, m. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. Nature Protoc., v. 2, n. 5, 1084-1104p., 2010.

Fröhner, Carla Regina Andrighetti. Avaliação da citotoxicidade, da genotoxicidade e da potencial atividade antiviral da violaceína. Dissertação, 2013. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/86072/191935.pdf?sequence=1&isAllOwed=y>.

Gisele et al. Avaliação da genotoxicidade induzida pela administração repetida de anestésicos locais. 2013. Disponível em: http://www.scielo.br/pdf/rba/v65n1/pt_0034-7094-rba-65-01-00021.pdf.

Hayashi, Makoto. The micronucleus test—most widely used in vivo genotoxicity test—. **Genes And Environment**, [s.l.], v. 38, n. 1, p.1-6, 1 out. 2016.

Hoffman, lindsey m.; gore, lia. blinatumomab, a bi-specific anti-cd19/cd3 bite® antibody for the treatment of acute lymphoblastic leukemia: perspectives and current pediatric applications. **frontiers in oncology**, usa, v. 4, p.1-5, 31 mar. 2014. frontiers media sa. <http://dx.doi.org/10.3389/fonc.2014.00063>.

Hovhannisyan, Galina G. Fluorescence in situ hybridization in combination with the comet assay and micronucleus test in genetic toxicology. **Molecular Cytogenetics**, Armenia, v. 3, n. 1, p.1-17, 2010.

Inca. **Instituto Nacional do Câncer - Estimativa 2018**. Disponível em: <<http://www1.inca.gov.br/estimativa/2018/estimativa-2018.pdf>>. Acesso: 20 jan. 2019.

J. da Silva et al.. O Ensaio Cometa na Avaliação da Genotoxicidade Induzida por Poluentes Atmosféricos Utilizando como Biomonitor o Molusco *Cantareus aspersus*. *J. Braz. Soc. Ecotoxicol.*, v. 2, n. 1, 2017, 45-51 Disponível em: https://ecotoxbrasil.org.br/upload/2e5d4d527e23cd725f1b9f4848d246d9-07_v2n1.pdf.

Kimura, A. et al. A combination of in vitro comet assay and micronucleus test using human lymphoblastoid TK6 cells. **Mutagenesis**, Japan, v. 28, n. 5, p.583-590, 17 jul. 2013.

Krüger, Rosangela Angelise. Análise Da Toxicidade E Da Genotoxicidade De Agrotóxicos Utilizados Na Agricultura Utilizando Bioensaios Com *Allium Cepa*. Dissertação. 2009. Disponível em: <https://aplicweb.feevale.br/site/files/documentos/pdf/29080.pdf>.

Molinari, Carmona et al. Avaliação dos efeitos ósseos tardios e composição corporal de crianças e adolescentes. *Tratados de Leucemia Linfóide Aguda Segundo Protocolos Brasileiros*, São Paulo, v. 1, n. 0103-0582, p.79-85, jan. 2017.

Moraes, Elisane Silveira et al. Análise de indivíduos com leucemia: limitações do sistema de vigilância de câncer. **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 10, p.3321-

Moreira, Thaís Celles. Avaliação da toxicidade e da genotoxicidade da ivermectina e da deltametrina através de bioensaio. UNIFAMINAS, MG, 2014. Disponível em: <http://unifaminas.edu.br/download/baixar/444>

Shaposhnikov, s.; frengen, e.; collins, a. R.. Increasing the resolution of the comet assay using fluorescent in situ hybridization--a review. **Mutagenesis**, [s.l.], v. 24, n. 5, p.383-389, 17 jun. 2009.

Teixeira, Luiz Antonio et al. O câncer no brasil. Passado e Presente, Rio de Janeiro, v. 1, n. 12-2676, p.1-182, jun. 2012.

Thayzi O. Zeni .Testes de avaliação de genotoxicidade. Rev Bras SP. 2015. Disponível em: <https://gia.org.br/portal/testes-de-avaliacao-de-genotoxicidade/>.

Tice, r.r. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. Environ. Mol. Mutagen., v. 35, 206–221p., 2013.

Valente et al. Utilização de biomarcadores de genotoxicidade e expressão gênica na avaliação de trabalhadores de postos de combustíveis expostos a vapores de gasolina. Rev. bras. saúde ocup. [online]. 2017, vol.42, suppl.1, e2s. Epub Apr 10, 2017. ISSN 0303-7657. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0303-76572017001000402&script=sci_abstract&tlng=pt.

Van der oost et al. Modulation of doxorubicin-induced genotoxicity by Aegle marmelos in mouse bone marrow: a micronucleus study. Integrative Cancer Therapies, Thousand, v. 6, n. 1, p. 42-53, 2016.

Zamith, Helena Pereira da Silva. Testes mutagênicos e carcinogênicos e sua respectiva importância em vigilância sanitária. Dissertação, 2015. Disponível em: <http://www.uezo.rj.gov.br/IV-Jornada-Farmacia/palestras/Helena%20Zamith%20-%20Testes%20mutag%C3%AAnicos%20e%20carcinog%C3%AAnicos%20e%20sua%20respectiva%20import%C3%A2ncia%20em%20vigil%C3%A2ncia%20sanit%C3%A1ria.pdf>