

IMPLEMENTAÇÃO E ADEQUAÇÃO DE PROTOCOLOS COM BIOMARCADORES PARA DESENVOLVIMENTO DE TESTES EM GENOTOXICIDADE AMBIENTAL.

AMANDA GUILHERMINA BARBOSA MALETZ^{1,2*} RODRIGO PATERA
BARCELOS³, SUZYMEIRE BARONI^{2,4}

1 Introdução

A intensificação das atividades humanas, como a agricultura extensiva, os processos industriais e o descarte inadequado de resíduos, tem promovido a crescente liberação de xenobióticos no ambiente, muitos dos quais são potencialmente genotóxicos. Essa realidade gera preocupações quanto aos efeitos desses compostos sobre organismos vivos, com relação as alterações no material genético que podem desencadear efeitos mutagênicos, carcinogênicos e genotóxicos.

Com o intuito de avaliar tais riscos, foram desenvolvidos diferentes protocolos para análise de danos genéticos e dentre eles destaca-se o Ensaio Cometa, ou Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE), desenvolvido inicialmente por Östling e Johanson em 1984, e posteriormente modificado por Singh et al. em 1988 para detectar danos ao DNA sob condições alcalinas. A técnica baseia-se na migração do DNA em um gel de agarose sob ação de um campo elétrico, formando uma estrutura visualmente semelhante a um cometa, com uma “cabeça” correspondente ao núcleo celular, e uma “cauda” formada a partir dos fragmentos de DNA. A intensidade e o comprimento dessa cauda refletem diretamente o grau de dano genético presente na célula.

2 Objetivos

O presente estudo tem como objetivo principal a implementação e adequação do

¹Acadêmica Ciências Biológicas - Bacharelado, Universidade Federal da Fronteira Sul *campus* Cerro Largo, contato: amanda.mmaletz@gmail.com

²Grupo de Pesquisa: Biociências

³Técnico e pesquisador -Laboratório de Genética Universidade Federal da Fronteira Sul *campus* Cerro Largo

⁴Orientadora e responsável pelo projeto. Universidade Federal da Fronteira Sul *campus* Cerro Largo

protocolo Ensaio Cometa, utilizando células da mucosa bucal como modelo biológico para detecção de danos ao material genético. O projeto busca validar essa abordagem alternativa à tradicional coleta de sangue periférico, a fim de oferecer uma técnica eficaz e menos invasiva para análise de danos no DNA em comunidades potencialmente expostas a agentes genotóxicos.

Pretende-se otimizar cada etapa do processo técnico, desde a coleta, preparo das amostras até a análise eletroforética e interpretação dos resultados. Essa adequação considera a padronização de reagentes, volumes e condições operacionais, garantindo a reprodutibilidade e qualidade dos dados obtidos. Desenvolvendo um protocolo mais rápido, acessível e adequado à realidade de pesquisas ambientais no interior brasileiro.

3 Metodologia

Esse projeto foi submetido e aprovado pelo CEP sob o CAAE: 86636025.1.0000.5564 em 26/02/2025.

A amostragem celular é realizada por meio de raspagem da superfície interna das bochechas direita e esquerda, utilizando escovas cervicais descartáveis. As amostras são armazenadas em microtubos eppendorf contendo fixador Saccomano, permitindo sua conservação por até sete dias.

As lâminas de microscopia são previamente preparadas com uma camada de agarose, que serve como base para a fixação das amostras celulares. Em seguida, estas passam por processo de lavagem e centrifugação a 590 rpm, com o objetivo de remover impurezas. As células são então ressuspensas em agarose low melting e aplicadas sobre as lâminas já preparadas, formando a camada de análise.

Posteriormente, as lâminas são submetidas à etapa de lise, com imersão na solução, permitindo a ruptura das membranas celulares e nucleares, expondo o conteúdo genético. Após a lise, são transferidas para cuba de eletroforese em condições alcalinas, permitindo a migração de fragmentos durante a aplicação de campo elétrico. O DNA danificado migra em direção ao ânodo, enquanto as moléculas intactas permanecem concentradas na região nuclear.

Concluída a eletroforese, procede-se à neutralização das lâminas durante 15 minutos, seguida da fixação em álcool absoluto por cinco minutos. A etapa final constitui na coloração das amostras com o corante fluorescente GelRed, possibilitando a visualização dos cometas ao microscópio de fluorescência.

A análise das lâminas conta com a observação de 50 células por amostra, classificadas de acordo com a extensão e na intensidade da cauda do cometa, conforme os critérios

estabelecidos por Tice et al. (1991) e Hartmann et al. (2003). O protocolo validado será posteriormente aplicado a dois grupos experimentais compostos por seis participantes, sendo homens ou mulheres de 19 a 49 anos, sendo um grupo controle (não fumantes, não alcoólicos e sem histórico de neoplasias) e outro grupo exposição (fumantes, alcoólicos e/ou com histórico de neoplasias), com o objetivo de avaliar a sensibilidade da técnica na detecção de danos genéticos.

4 Resultados e Discussão

A etapa inicial desta pesquisa consistiu na implementação e ajuste do protocolo do Ensaio Cometa utilizando células da mucosa bucal como matriz biológica. Os testes realizados com amostras dos próprios pesquisadores permitiram identificar pontos críticos na operacionalização da técnica e viabilizaram a padronização das condições experimentais, com vistas à aplicação futura em voluntários expostos a diferentes contextos ambientais.

Entre as melhorias implementadas, destaca-se a substituição dos tubos Falcon por microtubos eppendorf, o que resultou em maior concentração celular e manipulação mais eficiente das amostras, além de redução do volume dos reagentes.

Outro ponto importante observado nos testes foi a viabilidade da coleta por meio de escovas cervicais descartáveis. Demonstrando ser eficaz na obtenção de células epiteliais da mucosa bucal com mínima interferência mecânica e boa adesão à metodologia proposta, além de prática e rápida. Durante a fase de coloração, também fizemos um teste usando o corante DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) já que ele tem menor custo no mercado, mas não tivemos sucesso. O corante Gel-Red^R ainda tem melhor eficiência para o tipo celular que estamos estudando.

A próxima etapa é adequar volume ideal de DMSO para desagregar as células e obter melhoria no campo de visualização na microscopia. Até o momento tivemos dificuldades em obter células individualizadas em número suficiente para contagem.

5 Conclusão

Com a implementação e adequação do protocolo a técnica possui potencial para se tornar uma ferramenta eficaz no biomonitoramento genotoxicológico. O uso da mucosa bucal como matriz biológica apresenta vantagens importantes em relação a métodos tradicionais, como a coleta de sanguínea, por ser menos invasiva, de fácil execução e mais aceita pelos participantes, especialmente em estudos de campo e em populações vulneráveis.

Essa abordagem é particularmente relevante para o monitoramento de grupos expostos a xenobióticos, como trabalhadores rurais em contato com agrotóxicos, comunidades próximas a áreas industriais e populações em regiões com histórico de contaminação ambiental. Ao possibilitar a detecção precoce de danos ao DNA, o protocolo contribui para ações preventivas em saúde pública e controle ambiental.

Referências Bibliográficas

HARTMANN, A. et al. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. **Mutagenesis**, v. 18, n. 1, p. 45-51, 2003.

ÖSTLING, O., JOHANSON K.J. Microelectrophoretic study of radiation- induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochem Biophys Res Commun** 123:291–298, 1984.

SINGH, N. P. et al. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, p. 184-191, 1988.

TICE, R. R. et al. The single cell gel (SCG) assay: an electrophoretic technique for the detection of DNA damage in individual cells. In: **Biological Reactive Intermediates IV: Molecular and Cellular Effects and Their Impact on Human Health**. Boston, MA: Springer New York, 1991. p. 157-164

Palavras-chave: Ensaio cometa. Dano cromossômico. Biomonitoramento.

Nº de Registro no sistema Prisma: PES-2024-0102

Financiamento

