

**IMPLEMENTAÇÃO E ADEQUAÇÃO DE DOIS PROTOCOLOS COM
BIOMARCADORES PARA DESENVOLVIMENTO DE TESTES EM
GENOTOXICIDADE AMBIENTAL COM CÉLULAS DE MUCOSA BUCAL: ETAPA 2.**

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

1 Introdução

O aumento da exposição humana a diferentes xenobióticos presentes no ambiente tem gerado preocupação quanto aos possíveis efeitos celulares dessas substâncias (Bolong et al., 2009), levando ao desenvolvimento de diferentes biomarcadores para a avaliação de danos genéticos.

Podemos pontuar o Ensaio Cometa (SCGE - Single-Cell Gel Eletrophoresis), que por sua vez apresenta vantagens em relação a outros testes de genotoxicidade, que incluem sua sensibilidade para detectar baixos níveis de danos ao DNA, a necessidade de um pequeno número de células por amostra, flexibilidade, fácil aplicação e o curto tempo necessário para concluir um estudo. No entanto, o ensaio cometa não é utilizado para verificar mutações e sim usado para analisar lesões genômicas que se não forem corrigidas, podem levar às mutações (Gontijo; Tice, 2003), se trata de uma técnica útil para o estudo de danos e reparos no DNA.

A técnica baseia-se na migração do DNA em gel de agarose sob a ação de um campo elétrico, formando uma estrutura semelhante a um cometa, cuja cauda indica a presença e a intensidade das lesões no DNA.

O presente estudo buscou utilizar células da mucosa bucal como material celular de análise, visando menor incômodo aos participantes que não se submetem a punção de sangue. Objetivamos usar células da mucosa bucal usando protocolo sugerido por Thomas et.al (2009) e adequando variáveis para o teste Cometa.

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

2 Grupo de Pesquisa: Biociências

3 Mestre em Biologia Comparada; Técnico - Laboratório de Genética Universidade Federal da Fronteira Sul *campus* Cerro Largo

4 Doutora em Genética e Melhoramento, Universidade Federal da Fronteira Sul *campus* Cerro Largo. Orientadora.

2 Objetivos

Aplicamos o ensaio cometa utilizando o protocolo proposto por Singh et al. (1988), e os adaptamos somando parte da técnica descrita por Thomas et al. (2009), onde utiliza-se a mucosa bucal como material biológico, em vez de linfócitos. A sua implementação exigiu sucessivas adequações metodológicas para melhor desempenho da técnica, uma vez que sua aplicação tem sido tradicionalmente realizada com células de sangue periférico. A utilização da mucosa bucal apresenta-se como uma alternativa menos invasiva à coleta de sangue, especialmente em estudos com populações pediátricas. Além disso, o uso desse material biológico possibilita a realização conjunta do Ensaio Cometa e do Teste de Micronúcleos (BMCyt) a partir de uma única coleta, favorecendo sua aplicação em futuras pesquisas de biomonitoramento e genotoxicidade ambiental.

3 Metodologia

A coleta das células epiteliais da mucosa bucal foi realizada através da raspagem do interior das bochechas, utilizando de escovas cervicais estéreis e descartáveis.

As amostras foram imediatamente acondicionadas em microtubos tipo Eppendorf contendo solução fixadora de Saccomanno, permanecendo armazenadas sob refrigeração até o processamento laboratorial, por um período máximo de sete dias.

Para a preparação das lâminas, uma camada inicial de agarose foi previamente aplicada, constituindo a base de aderência para a amostra celular. Posteriormente, as amostras foram submetidas à etapa de lavagem por centrifugação a 1500 rpm, durante cinco minutos, visando à remoção do fixador e impurezas.

Após a obtenção do pellet celular as células foram ressuspensas em agarose *Low melting*, e aplicadas sobre as lâminas previamente preparadas. As lâminas foram então incubadas em solução de “lise”, permitindo a remoção das membranas celulares e nucleares. Em seguida, as lâminas foram transferidas para solução alcalina ($\text{pH} > 13$), promovendo o desenovelamento da dupla fita de DNA onde procedeu-se à eletroforese, durante a qual os fragmentos de DNA e as regiões contendo quebras migram em direção ao ânodo sob a ação do campo elétrico, formando a característica “cauda” do cometa, enquanto o DNA íntegro permanece concentrado na região correspondente à cabeça do cometa.

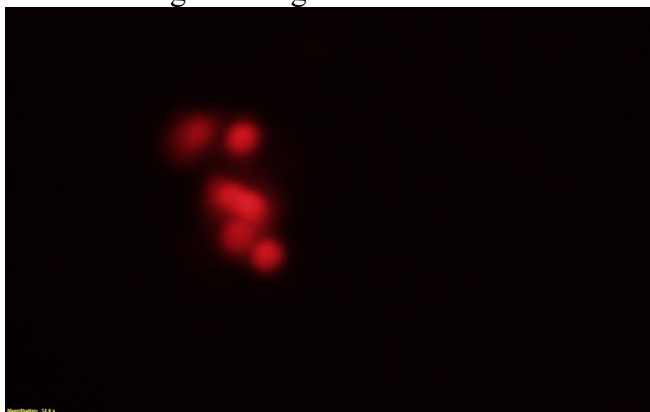
Ao final da eletroforese as lâminas foram submersas em uma cuba com neutralizador por 15 minutos, seguida da fixação em álcool absoluto durante cinco minutos. Após a secagem, realizou-se a coloração com corante fluorescente GelRed®, possibilitando a visualização dos nucleóides em microscópio de fluorescência.

A avaliação do dano ao DNA foi realizada mediante análise microscópica de 50 núcleos por amostra. Os cometas foram classificados visualmente de acordo com a intensidade e a extensão da migração do DNA, refletindo o grau de dano genético presente em cada célula, conforme os critérios propostos por Tice et al. (1991)

4 Resultados e Discussão

A utilização de células da mucosa bucal no Ensaio Cometa apresentou desafios metodológicos decorrentes das características do tecido epitelial, principalmente a elevada adesão celular e a tendência à formação de aglomerados, como observado na Figura 1.

Figura 1: Aglomerado celular



Fonte: Elaborado pelo autor (2026).

Esses fatores dificultaram a análise, que foi realizada com o auxílio do software CometScore, o qual considera apenas células isoladas e com morfologia adequada para a avaliação. Observou-se elevada variabilidade no número de células entre as amostras, possivelmente em razão da presença desses agrupamentos. O DMSO foi utilizado com o objetivo de reduzir a adesão celular, sendo aplicados 5 μ L por amostra. No entanto, essa quantidade não apresentou a eficácia esperada na dissociação das células. A utilização de volumes maiores também não se mostrou uma alternativa adequada, uma vez que foi observado que concentrações mais elevadas de DMSO podem causar danos às células, comprometendo

sua integridade e, conseqüentemente, a análise. A literatura sugere o uso de tripsina, no entanto esse reagente é de alto custo e não havia condições de adquiri-lo para tentarmos essa alternativa.

Mesmo com a aplicação de diferentes variáveis, incluindo volume das amostras, concentração de DMSO e a realização de três lavagens para a remoção de impurezas, não foram observadas mudanças significativas na quantidade de células isoladas aptas para a contagem. Considerando a necessidade de pelo menos 50 núcleos isolados para a validação do protocolo, a presença destes aglomerados comprometeu a validação do protocolo.

O trabalho de Russo et al. (2020) trouxe uma possibilidade a ser considerada, os autores utilizam a saliva como material biológico, realizando o isolamento de linfócitos para a aplicação do Ensaio Cometa. Os linfócitos apresentam características diferentes das células epiteliais, principalmente por não possuírem a mesma propriedade de adesão celular, o que facilita sua visualização nas lâminas. Dessa forma, o uso de linfócitos isolados a partir da saliva poderia ser considerado uma alternativa para estudos futuros.

5 Conclusão

Embora os resultados obtidos demonstrem que a utilização de células da mucosa bucal no ensaio cometa é tecnicamente viável e permite a detecção de alterações no material genético, conforme exemplificado pela visualização de um cometa na Figura 2, ainda assim as limitações observadas durante a padronização do protocolo, comprometem a repetibilidade e a robustez dos resultados.

Figura 2: Observação de um "cometa"



Fonte: Elaborado pelo autor (2026).

A técnica apresenta potencial como uma alternativa menos invasiva, no entanto o protocolo avaliado ainda não alcançou um nível de desempenho compatível com as exigências

necessárias para sua aplicação em pesquisas acadêmicas. São necessários estudos adicionais e novas adequações metodológicas para aumentar sua confiabilidade e repetibilidade, possibilitando futuras aplicações em estudos na área de genotoxicidade.

A proposta futura é tentar adequar a técnica de isolamento de linfócitos da mucosa bucal a fim de minimizar o uso de punção sanguínea nos participantes de nossas pesquisas.

Referências Bibliográficas

BOLONG, N.; ISMAIL, A. F.; SALIM, M. R.; MATSUURA, T. A review of the effects of emerging contaminants in wastewater and options for their removal. **Desalination**, v. 239, n. 1-3, p. 229–246, 2009. DOI: 10.1016/j.desal.2008.03.020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.desal.2008.03.020>. Acesso em: 06 agosto. 2026.

GONTIJO, A. M. M. C.; TICE, R. Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (Org.). **Mutagênese ambiental**. Canoas: Ulbra, 2003. p. 173–200.

RUSSO, Carla; ACITO, Mattia; FATIGONI, Cristina; VILLARINI, Milena; MORETTI, Massimo. B-Comet assay (comet assay on buccal cells) for the evaluation of primary DNA damage in human biomonitoring studies. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 24, p. 9234, 2020. DOI: 10.3390/ijerph17249234.

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.

THOMAS, P. *et al.* Buccal micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*, v. 4, n. 6, p. 825–837, maio 2009. DOI: 10.1038/nprot.2009.53.

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: Biomarcadores; Ensaio Cometa; Saúde ambiental

Nº de Registro no sistema Prisma: PES-2025-0247

Financiamento e Agradecimentos

