PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO COMETA EM LINFÓCITOS HUMANOS PARA BIOMONITORAMENTO OCUPACIONAL

Leticia Erks Santana Pires (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Eduardo Daniel Righi Dornelles, Camilla Yumi Endo, Hudson dos Santos Dourado, Edilson Nobuyoshi Kaneshima, Eliane Papa Ambrosio Albuquerque, Alice Maria de Souza-Kaneshima (Orientadora). Email: amskaneshima@uem.br

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Maringá, PR.

Área e subárea do conhecimento: Medicina/Anatomia Patológica e Patologia Clínica

Palavras-chave: Ensaio Cometa; Genotoxicidade; Câncer.

RESUMO

O ensaio cometa, ou eletroforese em gel de célula única (SCGE), é uma técnica sensível e versátil para detectar danos ao DNA em nível individual, baseando-se na migração de fragmentos genéticos que formam uma cauda proporcional à gravidade da lesão. O objetivo deste trabalho foi padronizar o ensaio cometa alcalino em linfócitos humanos para subsidiar o biomonitoramento de agricultores expostos a agrotóxicos na região norte-central do Paraná. O protocolo envolveu as etapas de isolamento/cultivo celular, preparação das lâminas, lise, eletroforese, neutralização, fixação, coloração e análise por microscopia de fluorescência. A padronização foi concluída com sucesso, estabelecendo condições operacionais reprodutíveis para a identificação de lesões no DNA. Conclui-se que a técnica é robusta, viável e adequada para aplicação em estudos futuros de genotoxicidade e vigilância em saúde ocupacional frente a agentes químicos.

INTRODUÇÃO

O ensaio cometa, também denominado eletroforese em gel de célula única (SCGE), é uma metodologia rápida, simples e altamente sensível para a detecção de danos ao DNA em nível individual (KUMARAVEL et al., 2009; GUNASEKARAN; RAJ; CHAND, 2015). O princípio do ensaio baseia-se na migração eletroforética de fragmentos de DNA danificados e de menor peso molecular — detentores de carga negativa — em direção ao ânodo através de uma matriz de agarose. Esse processo gera uma estrutura morfologicamente semelhante à cauda de um cometa (KUMARAVEL et al., 2009), cuja extensão e intensidade são diretamente proporcionais à magnitude do dano genético presente na célula (KUMARAVEL et al., 2009; CORDELLI; BIGNAMI; PACCHIEROTTI, 2021).

O ensaio pode ser conduzido sob condições neutras ou alcalinas (CORDELLI; BIGNAMI; PACCHIEROTTI, 2021; COLLINS et al., 2023). Em condições fisiológicas, quebras de fita e sítios apurínicos/apirimidínicos (AP) surgem continuamente devido

a processos como hidrólise ou ação de radicais livres, como o radical hidroxila (OH•) e a exposição a agentes químicos e físicos pode induzir um amplo espectro de lesões, incluindo modificações de bases nitrogenadas, sítios AP, ligações cruzadas (inter e intracadeias) e quebras diretas da fita de DNA (COLLINS et al., 2023). Historicamente, para a condição neutra é atribuída a detecção de quebras de fita dupla e à condição alcalina a identificação de quebras de fita simples e sítios AP, no entanto, evidências recentes sobre a dinâmica de migração do DNA demonstraram que o perfil de lesões detectado em ambas as variantes é significativamente sobreposto (CORDELLI; BIGNAMI; PACCHIEROTTI, 2021; COLLINS et al., 2023).
Dentre as principais vantagens da técnica, destaca-se a capacidade de avaliar o dano genômico individualizado por célula, o que confere maior robustez e poder às análises estatísticas. Somam-se a isso a baixa exigência de amostragem celular (<10.000 células/lâmina), a elevada sensibilidade e a aplicabilidade a diversos tipos de células eucarióticas, tanto em modelos in vitro quanto in vivo. Consequentemente, a metodologia é amplamente empregada para investigar o potencial genotóxico de agentes físicos e químicos em múltiplos sistemas biológicos (KUMARAVEL et al., 2009; GUNASEKARAN; RAJ; CHAND, 2015; COLLINS et al., 2023).
Nesse cenário, a padronização rigorosa dos parâmetros do ensaio cometa é indispensável para assegurar a reprodutibilidade e a confiabilidade dos resultados, sobretudo em investigações de biomonitoramento humano e exposição ocupacional a misturas complexas (CORDELLI; BIGNAMI; PACCHIEROTTI, 2021; COLLINS et al., 2023). Diante disso, este trabalho objetivou padronizar o ensaio cometa alcalino em linfócitos humanos, visando a sua aplicação na avaliação dos efeitos genotóxicos e citotóxicos em agricultores expostos ocupacionalmente a agrotóxicos na região nortecentral do Paraná.

MATERIAIS E MÉTODOS

Para a obtenção dos linfócitos, adicionaram-se a cada frasco de cultura 8,2 mL de meio RPMI, 1,5 mL de soro fetal bovino (SFB), 200 µL de fitohemaglutinina e de quatro a sete gotas de buffy coat. Em seguida, os frascos foram mantidos em incubadora do tipo BOD a 37 °C por 24 horas. Após a incubação, uma alíquota de 10 µL da suspensão celular de cada frasco foi homogeneizada com 120 µL de agarose de baixo ponto de fusão (LMP, low melting point) a 37 °C. A mistura foi pipetada sobre lâminas previamente revestidas com agarose de ponto de fusão normal, cobertas com lamínula e mantidas a 4 °C por 5 minutos para a solidificação do gel. Decorrido esse tempo, as lamínulas foram removidas e as lâminas permaneceram submersas em solução de lise pré-refrigerada a 4 °C, ao abrigo da luz, por um período de 1 a 24 horas. Na etapa seguinte, as lâminas foram dispostas em cuba eletroforética sob banho de gelo e protegidas da luz. Adicionou-se o tampão de eletroforese alcalino até a submersão completa das lâminas, mantendo-as em repouso por 20 minutos para a desnaturação/desenrolamento do DNA. A eletroforese foi conduzida a 25 V (~300 mA) por 25 minutos. Concluída a corrida, as lâminas foram submetidas à neutralização com 5 mL de tampão apropriado,

realizando-se três lavagens consecutivas de 5 minutos cada. Em seguida, foram secas em posição inclinada e fixadas por imersão em etanol absoluto por 5 minutos. Por fim, aplicaram-se 20 µL de brometo de etídio (2 µg/mL) sobre cada lâmina. Após a coloração com brometo de etídio, as lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência. A mensuração das imagens foi realizada com o auxílio do software ImageJ. As células foram categorizadas visualmente em cinco níveis de dano, segundo a metodologia descrita por Collins et al. (2008):Classe 0 (Nível 0): Células não danificadas, sem cauda visível; Classes 1 a 4 (Níveis 1 a 4): Células que apresentam lesões no material genético em graus crescentes de fragmentação e migração, sendo a Classe 1 indicativa de dano mínimo e a Classe 4 correspondente ao nível máximo de dano.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo, foram padronizados com sucesso as etapas fundamentais do ensaio cometa alcalino em linfócitos humanos, desde o preparo de reagentes e soluções até a confecção das lâminas, lise celular, corrida eletroforética, neutralização, fixação, coloração e análise por microscopia de fluorescência. O rigor no controle dessas variáveis metodológicas permitiu estabelecer um protocolo reprodutível e robusto para o rastreio de lesões no material genético. A consolidação desse protocolo viabiliza a detecção de danos ao DNA com base no padrão de migração eletroforética dos fragmentos genômicos. Células que mantêm a integridade do DNA apresentam nucleoides circulares e compactos, com ausência ou insignificante migração celular. Em contrapartida, células que sofreram lesões genotóxicas exibem migração proporcional dos fragmentos de menor peso molecular em direção ao ânodo, tendo a morfologia característica de cometa. A padronização obtida consolida uma base metodológica consistente para as etapas subsequentes da pesquisa, sendo uma opção para o biomonitoramento de populações humanas expostas ocupacionalmente a agrotóxicos na região nortecentral do Paraná, por permitir identificar precocemente o potencial citotóxico e genotóxico associado ao uso de misturas complexas de pesticidas agrícolas. A figura 1, demostra imagens de microfluorescência do ensaio cometa de células de linfócitos humano com os diferentes níveis de danos.

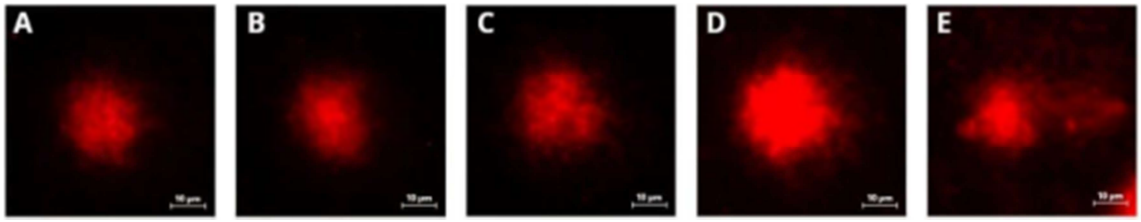


Figura 1. Análise do ensaio cometa por microfluorescencia de ensaio cometa de células de linfócitos humano (corante brometo de etídeo), Barra de escala = 10µm. A: Nível 0, B: Nível 1, C: Nível 2, D: Nível 3 e E: Nível 4

CONCLUSÕES

A padronização das etapas do ensaio cometa alcalino em linfócitos humanos estabeleceu um protocolo experimental reprodutível, robusto e de alta sensibilidade

para a avaliação de lesões no material genético. A metodologia mostrou-se eficaz na preservação da integridade celular e na clara diferenciação visual dos níveis de fragmentação do DNA (Classes 0 a 4) com o auxílio do software ImageJ, confirmando a viabilidade operacional do procedimento. Em suma, o protocolo padronizado consolida uma importante ferramenta biomédica para aplicação em estudos futuros de vigilância e biomonitoramento humano. Sua implementação permitirá mensurar de forma precisa os impactos citotóxicos e genotóxicos decorrentes da exposição ocupacional a agrotóxicos em agricultores da região norte-central do Paraná, fornecendo subsídios científicos para ações de prevenção e saúde trabalhista.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Universidade Estadual de Maringá e a Fundação Araucária pelo apoio e contribuição para a realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS

COLLINS, A.; MØLLER, P.; GAJSKI, G.; et al. Measuring DNA modifications with the comet assay: a compendium of protocols. **Nature Protocols**, v. 18, n. 3, p. 929-989, 2023. DOI: 10.1038/s41596-022-00754-y. Disponível em: https://www.nature.com/articles/s41596-022-00754-y. Acesso em: 14 ago. 2026.

CORDELLI, E.; BIGNAMI, M.; PACCHIEROTTI, F. Comet assay: a versatile but complex tool in genotoxicity testing. **Toxicology Research**, v. 10, n. 1, p. 68-78, 2021. DOI: 10.1093/toxres/tfaa093. Disponível em: https://academic.oup.com/toxres/article/10/1/68/6047181. Acesso em: 14 ago. 2026.

GUNASEKARAN, V.; RAJ, G. V.; CHAND, P. A comprehensive review on clinical applications of comet assay. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 9, n. 3, p. GE01-GE05, 2015. DOI: 10.7860/JCDR/2015/12062.5622. Disponível em: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4413081/. Acesso em: 14 ago. 2026.

KUMARAVEL, T. S.; VILHAR, B.; FAUX, S. P.; JHA, A. N. Comet Assay measurements: a perspective. **Cell Biology and Toxicology**, v. 25, n. 1, p. 53-64, 2009. DOI: 10.1007/s10565-007-9043-9. Disponível em: https://link.springer.com/article/10.1007/s10565-007-9043-9. Acesso em: 14 ago. 2026.