

Implementação da Técnica de Aberrações Cromossômicas para o Monitoramento da Exposição Ocupacional a Agentes Genotóxicos no Laboratório de Toxicologia do INCA

<https://doi.org/10.32635/2176-9745.RBC.2026v72n4.5681>

Implementation of the Chromosomal Aberration Technique for Monitoring Occupational Exposure to Genotoxic Agents in INCA's Toxicology Laboratory

Implementación de la Técnica de Aberraciones Cromosómicas para el Monitoreo de la Exposición Ocupacional a Agentes Genotóxicos en el Laboratorio de Toxicología del INCA

Ana Paula Castilho¹; Katia Soares da Poça²; Maria Theresa de Souza Accioly Martins³; Márcia Sarpa de Campos Mello⁴

RESUMO

Introdução: A exposição ocupacional a agentes químicos está associada a danos genéticos e ao aumento do risco de doenças, incluindo câncer. O biomonitoramento permite detecção precoce de alterações genéticas e apoio a medidas preventivas. **Objetivo:** Implementar e padronizar o teste de aberrações cromossômicas no Laboratório de Toxicologia Ocupacional, Ambiental e Vigilância do Câncer da Coordenação de Prevenção e Vigilância do Instituto Nacional de Câncer, visando à sua aplicação em projetos de biomonitoramento de trabalhadores expostos a agentes genotóxicos. **Método:** Foi desenvolvido um protocolo operacional padrão baseado em literatura, diretrizes internacionais e experiência técnica. O estudo-piloto incluiu controle negativo (indivíduos saudáveis) e controle positivo (amostras expostas *in vitro* a metil metanossulfonato em duas concentrações). As lâminas foram preparadas e coradas com Giemsa, e quando necessário o bandejamento G, analisando-se 300 metáfases por amostra com microscopia óptica e sistemas de captura de imagem. Alterações cromossômicas estruturais e numéricas foram avaliadas. **Resultados:** A análise permitiu implementar a técnica e padronizar o protocolo, demonstrando sua eficácia para identificar alterações genéticas em condições experimentais controladas. **Conclusão:** O protocolo é adequado para futuros projetos de biomonitoramento, fornecendo ferramenta confiável para avaliação precoce de danos genéticos e prevenção de riscos ocupacionais.

Palavras-chave: Neoplasias; Exposição Ocupacional/prevenção & controle; Aberrações Cromossômicas; Monitoramento Biológico; Genotoxicidade.

ABSTRACT

Introduction: Occupational exposure to chemical agents is associated with genetic damage and an increased risk of diseases, including cancer. Biomonitoring enables early detection of genetic alterations and supports preventive measures. **Objective:** To implement and standardize the chromosomal aberration test at the Laboratory of Occupational and Environmental Toxicology and Cancer Surveillance from the Prevention and Surveillance Coordination of the National Cancer Institute, aiming its application in biomonitoring projects for workers exposed to genotoxic agents. **Method:** A standard operational protocol was developed based on the literature, international guidelines, and technical expertise. The pilot study included a negative control (healthy individuals) and a positive control (samples exposed *in vitro* to methyl methanesulfonate at two concentrations). Slides were prepared and stained with Giemsa, and when necessary, G-banding, analyzing 300 metaphases per sample using optical microscopy and imaging capture systems. Structural and numerical chromosomal alterations were assessed. **Results:** The analysis warranted the implementation of the technique and standardization of the protocol, demonstrating its effectiveness in detecting genetic alterations under controlled experimental conditions. **Conclusion:** The protocol is suitable for future biomonitoring projects, providing a reliable tool for early evaluation of genetic damage and prevention of occupational risks.

Key words: Neoplasms; Occupational Exposure/prevention & control; Chromosomal Aberrations; Biological Monitoring; Genotoxicity.

RESUMEN

Introducción: La exposición ocupacional a agentes químicos se asocia con daños genéticos y un mayor riesgo de enfermedades, incluido el cáncer. El biomonitoreo permite la detección temprana de alteraciones genéticas y el apoyo a medidas preventivas. **Objetivo:** Implementar y estandarizar la prueba de aberraciones cromosómicas en el Laboratorio de Toxicología Ocupacional, Ambiental y Vigilancia del Cáncer, de la Coordinación de Prevención y Vigilancia del Instituto Nacional del Cáncer, con el fin de aplicarla en proyectos de biomonitoreo de trabajadores expuestos a agentes genotóxicos. **Método:** Se desarrolló un protocolo operativo estándar basado en la literatura, directrices internacionales y experiencia técnica. El estudio piloto incluyó un control negativo (individuos sanos) y un control positivo (muestras expuestas *in vitro* a metanosulfonato de metilo en dos concentraciones). Se prepararon las láminas y se tiñeron con Giemsa y, cuando fue necesario, con bandeo G, analizándose 300 metafases por muestra mediante microscopía óptica y sistemas de captura de imágenes. Se evaluaron alteraciones cromosómicas estructurales y numéricas. **Resultados:** El análisis permitió implementar la técnica y estandarizar el protocolo, demostrando su eficacia para identificar alteraciones genéticas en condiciones experimentales controladas. **Conclusión:** El protocolo es adecuado para futuros proyectos de biomonitoreo, proporcionando una herramienta confiable para la evaluación temprana de daños genéticos y prevención de riesgos ocupacionales.

Palabras clave: Neoplasias; Exposición Laboral/prevenición y control; Aberraciones Cromosómicas; Monitoreo Biológico; Genotoxicidad.

¹Instituto Nacional de Câncer (INCA), Coordenação de Prevenção e Vigilância (Conprev), Laboratório de Toxicologia Ocupacional, Ambiental e Vigilância do Câncer (LabTox). Rio de Janeiro (RJ), Brasil. E-mails: ana.castilho@inca.gov.br; katiapoça@gmail.com; maccioly@inca.gov.br; marcia.sarpa@inca.gov.br. Orcid iD: <https://orcid.org/0009-0006-0691-282X>; Orcid iD: <https://orcid.org/0000-0002-8121-8700>; Orcid iD: <https://orcid.org/0000-0002-1423-0398>; Orcid iD: <https://orcid.org/0000-0001-8976-4653>

Endereço para correspondência: Ana Paula Castilho. Rua Retiro dos Artistas, 236, apto. 306 – Pechincha. Rio de Janeiro (RJ), Brasil. CEP 22770-103. E-mail: ana.castilho@inca.gov.br



INTRODUÇÃO

Os efeitos nocivos dos agentes químicos sobre a saúde humana têm sido amplamente estudados desde o século passado, sendo uma realidade presente especialmente no contexto ocupacional, no qual a exposição a substâncias mutagênicas e carcinogênicas representa um relevante problema de saúde pública e do trabalhador. Evidências científicas apontam que a exposição ocupacional a esses agentes está associada a um risco aumentado de desenvolvimento de diversas doenças, como distúrbios neurológicos, alterações reprodutivas e câncer¹. A toxicidade desses agentes depende de uma série de fatores, incluindo suas propriedades químicas inerentes, bem como as interações químicas em virtude da presença de outros agentes que compõem a formulação desses produtos, como estabilizantes, solventes, impurezas, aditivos e agrotóxicos. Esses compostos podem causar danos genéticos, o que representa um fator de grande relevância para a saúde pública, especialmente para a saúde do trabalhador, em razão da relação já estabelecida entre genotoxicidade e o desenvolvimento de câncer.

Nesse contexto, o biomonitoramento de indivíduos expostos tem se destacado como uma ferramenta essencial de avaliação na vigilância em saúde, permitindo a detecção precoce de efeitos biológicos adversos e apoiando a implementação de medidas preventivas e corretivas no ambiente de trabalho, em decorrência da exposição a substâncias químicas^{2,3}.

O potencial genotóxico de substâncias químicas pode ser avaliado por meio de uma variedade de ensaios relacionados à toxicologia genética, tais como o teste do micronúcleo, ensaio cometa e o teste de aberrações cromossômicas, os quais detectam danos no DNA⁴.

Uma das consequências biológicas da exposição humana aos agentes químicos é a indução de alterações nos cromossomos, que são observadas por meio do uso da metodologia chamada aberrações cromossômicas. O estudo das aberrações cromossômicas é uma avaliação citogenética clássica, amplamente validada e aceita internacionalmente, que consiste na análise dos cromossomos obtidos por culturas de linfócitos humanos *in vitro*. Essa técnica é considerada um importante biomarcador de efeitos precoces de carcinógenos genotóxicos em abordagens de exposição ambiental e ocupacional. É essencial para compreender as alterações que podem ocorrer no material genético, e sua complexidade reside na necessidade de preparação adequada das amostras, na coloração específica dos cromossomos e na interpretação criteriosa dos resultados.

Uma das vantagens de avaliar os linfócitos humanos é o fato de eles circularem por todo o organismo⁵,

o que os expõem a qualquer agente mutagênico, independentemente da via de introdução do agente no organismo, seja por via oral, inalatória e dérmica.

As aberrações cromossômicas são divididas em dois tipos: alterações numéricas e alterações estruturais. As alterações numéricas se caracterizam pela modificação do número de cromossomos, podendo haver perdas ou ganhos, diferente do número diploide (2n=46 cromossomos). Já as alterações estruturais se caracterizam por modificações na estrutura dos cromossomos e são chamadas de alterações cromossômicas quando ocorrem simultaneamente nas duas cromátides, ou alterações cromatídicas que envolvem uma só cromátide.

Evidências indicam uma correlação positiva entre o aumento da frequência de aberrações cromossômicas em linfócitos e o risco de desenvolvimento de doenças, como as neoplasias⁵, o que reforça a relevância do uso desses biomarcadores em programas de biomonitoramento ocupacional.

O Laboratório de Toxicologia Ocupacional, Ambiental e Vigilância do Câncer (LabTox) desenvolve projetos de pesquisa voltados à saúde do trabalhador, avaliando a exposição ocupacional a agentes potencialmente mutagênicos e carcinogênicos. Nesse contexto, a implementação da técnica de aberrações cromossômicas representa uma importante ampliação das metodologias de toxicologia genética já empregadas no laboratório para avaliação de danos no DNA, possibilitando análises complementares e, dessa forma, contribuindo para maior robustez interpretativa dos resultados, além de fortalecer a precisão metodológica e a reprodutibilidade analítica em futuros projetos de pesquisa em biomonitoramento desenvolvidos no LabTox.

Diante da importância desse biomarcador, o presente estudo tem como objetivo não apenas implementar o teste de aberrações cromossômicas no LabTox para aplicação em biomonitoramento de trabalhadores expostos a agentes mutagênicos, carcinogênicos e/ou potencialmente carcinogênicos, com a proposta de avaliar os potenciais riscos à saúde, em projetos de pesquisa aprovados pelo Comitê de ética em Pesquisa (CEP) do Instituto Nacional de Câncer (INCA), mas também integrá-lo às demais metodologias já implantadas no laboratório, ampliando, assim, o escopo e a robustez dos resultados obtidos.

MÉTODO

Para a implementação da técnica e elaboração do protocolo operacional padrão do teste de aberrações cromossômicas, foi conduzida uma revisão bibliográfica abrangente sobre o tema, alinhada à experiência técnica acumulada ao longo de anos da profissional responsável

pela execução e interpretação do teste de aberrações cromossômicas. Em todas as etapas, os procedimentos adotados foram guiados por diretrizes internacionais (OECD)⁶, bem como pelos requisitos da Norma PALC – Programa de Acreditação de Laboratórios Clínicos⁷, garantindo conformidade com as recomendações da literatura científica e com boas práticas laboratoriais consolidadas na rotina do laboratório.

Dessa forma, o protocolo operacional padrão foi elaborado com a descrição detalhada de cada etapa da rotina operacional e experimental adotada no teste.

Para o estudo-piloto, dois grupos foram avaliados: (1) grupo controle negativo, composto por amostras de sangue periférico de voluntários clinicamente saudáveis, sem histórico de exposição ocupacional a agentes químicos; (2) grupo controle positivo, constituído por amostras de sangue periférico de voluntários nas mesmas condições do grupo controle negativo com a adição do agente mutagênico Metil Metano Sulfonato (MMS – Sigma®), em diferentes concentrações à cultura celular, para a indução de alterações cromossômicas *in vitro*.

As amostras de sangue periférico foram coletadas em tubos com heparina e acondicionadas sob refrigeração (2 a 4 °C) até o processamento. As culturas de linfócitos foram preparadas em tubo Falcon de 15 ml contendo 5 ml de meio PB-MAX (Gibco®), um meio comercial pronto para cariótipo, composto por: RPMI, enriquecido com Soro Fetal Bovino (SFB), suplementado com fito-hemaglutinina (PHA) e 1,0 ml de sangue total, incubados em estufa de CO₂, (5%) a 37 °C.

As culturas das amostras pertencentes ao grupo controle negativo foram representadas por dois voluntários, e considerados dois tempos distintos de cultivo: 48 e 72 horas. Para o grupo controle positivo, as culturas foram representadas por quatro voluntários, sob os mesmos tempos de cultivo. O agente mutagênico MMS foi adicionado às culturas após 24 horas (nas culturas de 48 h) e após 48 horas (nas culturas de 72 h), garantindo exposição de 24 horas ao agente. Foram testadas duas concentrações distintas: 80 µM e 160 µM, conforme diretrizes da OECD, e de acordo a literatura especializada^{8,9}, com o objetivo de identificar o intervalo experimental que proporcionasse melhor rendimento celular e selecionar a condição que apresentasse o efeito citogenético desejado para a definição do protocolo do ensaio.

Passado o período de incubação, 48 ou 72 horas variando entre mais ou menos 1 hora antes ou depois, foram adicionados 0,165 µg/ml de colchicina (Sigma®) em todas as amostras com o objetivo de interromper a formação do fuso mitótico e bloquear a divisão celular em metáfase. A seguir, as culturas foram novamente incubadas por mais 1 hora a 37 °C.

Ao final desse período, os tubos foram centrifugados a 1.500 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi retirado e, em seguida, foram adicionados 10 ml de solução hipotônica, (KCl 0,075 M), homogeneizados e mantidos a 37 °C em banho-maria por 30 minutos.

Após esse tempo, os tubos foram novamente centrifugados, o sobrenadante foi retirado e iniciou-se a etapa de fixação, na qual foram adicionados 10 ml de fixador recém-preparado e refrigerado (solução de Carnoy; metanol e ácido acético, ambos da Merck na proporção 3:1), com mais duas etapas sucessivas de lavagem com fixador, deixando o *pellet* cada vez mais limpo, nas quais foram adicionados 5 ml de fixador em cada uma, seguidas de centrifugação.

Após as etapas de lavagem e da última centrifugação, aproximadamente 0,5 mL do fixador foi mantido junto ao sedimento celular (*pellet*), sendo a suspensão homogeneizada para o preparo das lâminas. Estas foram confeccionadas pela técnica de gotejamento da suspensão celular e dispostas em placa aquecida a 50 °C, por 10 a 15 minutos, ou mantidas à temperatura ambiente para secagem. Em média, foram preparadas de duas a quatro lâminas por participante.

Para a coloração das lâminas, foi preparada uma solução de Giemsa a 5% diluída em tampão fosfato salino (PBS), em um *Coplin jar*, onde as lâminas foram dispostas e mantidas por 5 minutos, lavadas em água corrente, e o processo de secagem aconteceu à temperatura ambiente.

A Figura 1 mostra de forma esquemática todas as etapas necessárias para a realização do teste de aberrações cromossômicas.

Toda a técnica foi baseada no método originalmente desenvolvido¹⁰, com as devidas modificações e adaptações. Antes da padronização definitiva do protocolo operacional padrão, foram realizados testes com os controles negativos e positivos, seguidos de ajustes para aprimorar a qualidade e quantidade das células. Esses ajustes incluíram: (1) aumento do volume de sangue de 0,5 ml para 1,0 ml, por cultura, para elevar a densidade leucocitária; (2) otimização do bloqueio mitótico com colchicina mediante o ajuste da concentração para 0,165 µg/ml, após diferentes testes (intervalo testado de 0,033 a 0,165 µg/ml), com tempo de exposição para 60 minutos (testado entre 30 a 60 minutos), garantindo um índice mitótico satisfatório, sem comprometer a morfologia cromossômica; (3) padronização do tratamento hipotônico (KCl 0,075 M) por 30 minutos (testado de 20 a 30 minutos), favorecendo a dispersão cromossômica; (4) ajuste da velocidade de centrifugação para 1.500 rpm (testado entre 1.500 a 1.800 rpm) para assegurar a integridade do *pellet*. Tais adaptações foram fundamentais para a adequação do protocolo, resultando em maior preservação da integridade estrutural

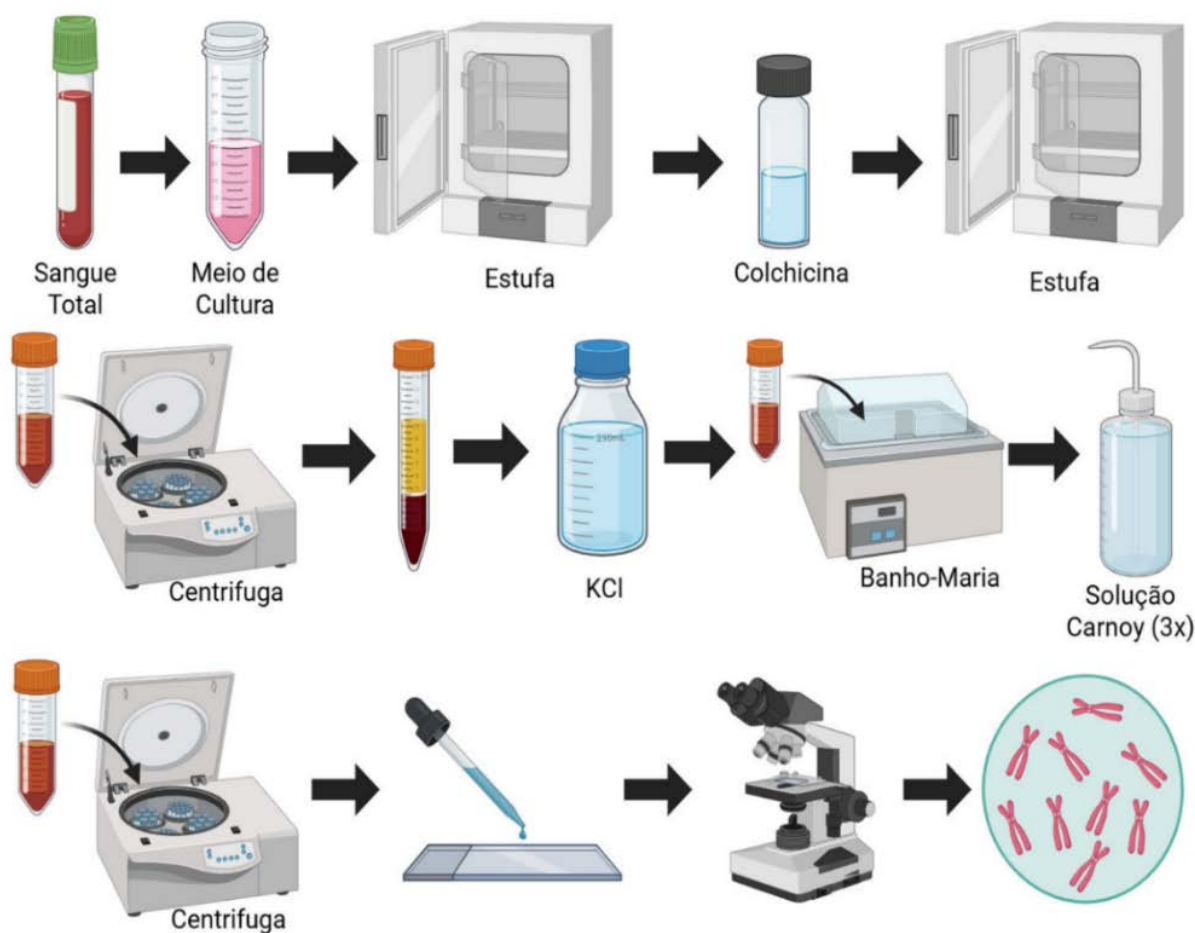


Figura 1. Fluxograma do teste de aberrações cromossômicas, demonstrando todas as etapas

Nota: Imagem confeccionada com base no método descrito usando programa *BioRender*.

dos cromossomos, essencial para a eficiência na detecção de danos genotóxicos.

As lâminas foram analisadas em microscópio óptico com o objetivo de avaliar a qualidade do material, por meio da triagem da frequência de metáfases e da morfologia dos cromossomos, além de verificar a concentração da suspensão celular (Figura 2). O índice mitótico foi avaliado por meio da contagem do número de metáfases encontradas em 1.000 linfócitos observados.

Além da coloração convencional, a técnica de bandeamento G também foi testada, de acordo com o

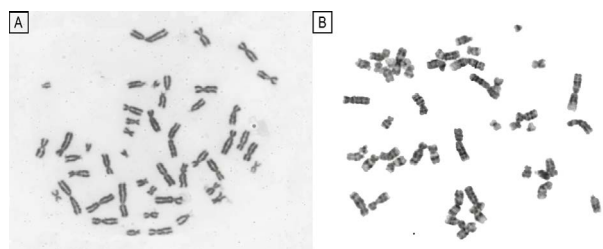


Figura 2. Imagem de cromossomos humanos em metáfase, sem alterações (cultura de linfócitos): (A) Cromossomos em coloração convencional; (B) Cromossomos - Com banda G

Nota: Imagens obtidas pelo Sistema de Análises *Metafer*.

método original¹¹, com modificações. A técnica consiste no tratamento dos cromossomos com tripsina, cuja função é desnaturar as proteínas dos cromossomos, digerindo parcialmente as regiões cromossômicas, apresentando assim dois padrões de bandas: as regiões heterocromáticas, que tendem a ser ricas em adenina e timina (AT) e que produzem um padrão de bandas mais escuras; e as regiões de eucromatina, que tendem a ser ricas em guanina e citosina (GC), incorporam menos Giemsa e formam bandas claras (Figura 2B). Para a realização do bandeamento, as lâminas foram submetidas ao processo de envelhecimento por períodos que variaram entre 2 e 4 horas em placa aquecida a 50 °C, 24 horas em estufa a 37 °C ou 72 horas em temperatura ambiente. Vale lembrar que as condições ideais para o bandeamento podem variar significativamente em função de diversos fatores, como temperatura e umidade do ambiente, tempo de cultura, qualidade das lâminas, entre outros.

Para o bandeamento, foi preparada a solução de tripsina (Sigma®), 0,10 g, dissolvida em 100 ml de tampão Dulbecco e aquecida a 37 °C. As lâminas foram submetidas à tripsinização em *Coplin jar* por períodos de 5 a 60 segundos,

com tempo de exposição proporcional ao período e à condição do envelhecimento. Em seguida, banhadas com solução fisiológica e, por fim, realizada a coloração com Giemsa 5% por 5 minutos, lavadas com água corrente e mantidas à temperatura ambiente para secagem.

As lâminas foram inicialmente analisadas ao microscópio óptico, o índice mitótico foi avaliado e realizada a contagem de 300 metáfases em coloração convencional (conforme recomendação da OECD), considerando apenas as células com 44 a 46 cromossomos ou mais. As amostras que precisaram ser avaliadas por cariótipo, com o objetivo de confirmar alterações constitucionais, foram submetidas à técnica de bandeamento G, o que permitiu uma melhor análise das alterações e a identificação dos cromossomos envolvidos. Quando necessário, foram cariotipadas 20 metáfases por indivíduo de acordo com normas de qualidade, e o resultado foi descrito segundo a *International System for Human Cytogenomic Nomenclature* (ISCN)¹².

Vale ressaltar que a identificação do cariótipo é realizada exclusivamente após o bandeamento G, que permite uma análise minuciosa com a distinção dos pares dos cromossomos autossômicos e sexuais, além da detecção de alterações mais sutis como deleções, inversões, duplicações entre outras. Todas as análises foram conduzidas por dois ou mais analistas treinados, ou seja, sempre com dupla conferência e revisadas sempre que necessário, conforme recomendações de normas de qualidade.

As células observadas com aberrações cromossômicas foram registradas em tabela e classificadas por tipos e quantidade de alterações. As alterações incluíam translocações, quebras e falhas cromatídicas, entre outras. Essa categorização facilitou a análise estatística.

Para otimizar as análises e a construção dos cariótipos, além da contagem manual em microscópio, as lâminas também foram avaliadas por meio de sistema de análise integrado à captura de imagens, equipado com ferramentas de edição. Foram utilizados o sistema semiautomatizado *Metafer*¹³ (software da *MetaSystems*) e o sistema manual *GeneALL*¹⁴ (*OutSet*).

O estudo-piloto foi conduzido com uma amostra de conveniência composta por seis voluntários, funcionários do próprio laboratório, do sexo feminino, com faixa etária entre 21 e 31 anos, os quais foram informados que as amostras de sangue seriam utilizadas exclusivamente para fins de controle interno e padronização da metodologia. Tais amostras foram aleatoriamente distribuídas em grupos de dois voluntários para cada condição experimental, visando à otimização de variáveis e à padronização do protocolo padrão a ser utilizado no laboratório. Os voluntários foram questionados quanto à exposição de radiação ionizante (raio X, tomografia computadorizada, densitometria óssea, cintilografia e mamografia), pois são

variáveis de confundimento para o efeito genotóxico a ser verificado no ensaio.

Os testes realizados neste estudo permitiram implementar e padronizar a técnica de aberrações cromossômicas para ser utilizada em projetos de pesquisa que avaliam a exposição ocupacional a agentes químicos no ambiente de trabalho. O estudo foi previamente aprovado pelo CEP/INCA sob o número de parecer 2.983.493 (CAAE: 64799217.3.0000.5274), vinculado ao projeto “Investigação dos efeitos tóxicos sobre a saúde de trabalhadores do município de Casimiro de Abreu (RJ) expostos a agrotóxicos”, que incluía a técnica aberrações cromossômicas, conforme os aspectos éticos relativos à pesquisa com seres humanos, segundo a Resolução nº. 466/12¹⁵ do Conselho Nacional de Saúde.

RESULTADOS

A análise microscópica das amostras permitiu a classificação das metáfases e dos cromossomos com base em parâmetros descritos na literatura citogenética, como o número de metáfases obtidas, integridade e morfologia cromossômica, grau de espalhamento e sobreposição dos cromossomos (Quadro 1).

As diferentes condições de cultura utilizadas para a otimização e a padronização da técnica de aberrações cromossômicas estão detalhadas na Tabela 1. As amostras foram distribuídas de forma aleatória em grupos de dois

Quadro 1. Classificação das condições de cultura após avaliação microscópica

Avaliação	Classificação	Critério
Quantitativa	Boa	100 metáfases ou mais por lâmina
Quantitativa	Razoável	Entre 50 e 100 metáfases por lâmina
Quantitativa	Baixa	Menos de 50 metáfases por lâmina
Quantitativa	Insuficiente ou ATM	Poucas ou ausência total de metáfases
Qualitativa	Boa	Cromossomos íntegros, morfologia nítida, bom espalhamento e mínima sobreposição
Qualitativa	Razoável	Cromossomos pouco condensados ou muito espalhados, moderada sobreposição e citoplasma moderado
Qualitativa	Ruim	Cromossomos aglomerados, excesso de condensação e muito citoplasma

Legenda: ATM = Ausência Total de Metáfases.



voluntários para cada condição experimental, considerando variações no tempo de cultura, volume de sangue, concentração de MMS, concentração e tempo de exposição da colchicina, além do tempo de hipotonização com KCL.

Os resultados mostram que culturas de 48 horas comparadas às de 72 horas tiveram baixo rendimento nas diferentes condições experimentais, seja para amostras consideradas controle positivo ou mesmo controle negativo, como pode ser observado na Tabela 1.

Ao avaliar especificamente as culturas tratadas com o agente MMS, utilizadas como controle positivo, o tempo de cultura de 48 horas não apresentou resultados satisfatórios, evidenciando baixo índice mitótico e metáfases com cromossomos com baixa qualidade. Por essa razão, esse tempo de cultura foi descartado para os controles positivos, sendo mantido apenas o tempo de 72 horas com as concentrações de MMS determinadas. Em contrapartida, as culturas não tratadas com MMS (controles negativos) apresentaram resultados satisfatórios, em ambos os tempos de cultura (48 h e 72 h). Assim, os

dois períodos foram estabelecidos como padrão. Todas as culturas foram identificadas como C1 para o tempo de 48 horas, enquanto, para o tempo de 72 horas de cultivo, foram identificadas como C2.

A avaliação microscópica dos cromossomos metafásicos de amostras tratadas com o controle positivo MMS mostrou presença das alterações estruturais como: quebra cromatídica (5,5%, n=2), cromossomo dicêntrico (5,5%, n=2), fragmento acêntrico (16,6%, n=6), minutos cromossômicos (25%, n=9), separação centromérica (11,1%, n=4), translocação (8,3%, n=3), falha cromatídica (25%, n=9), cromossomo quadricêntrico (2,7%, n=1), comprovando a sensibilidade do método para a detecção de danos induzidos (Figura 3).

DISCUSSÃO

A implementação do teste de aberrações cromossômicas no LabTox possibilitou a consolidação de um protocolo padronizado, fundamentado em diretrizes internacionais,

Tabela 1. Caracterização das diferentes variáveis utilizadas

Tempo de cultura (h)	Volume de sangue (ml)	Concentração MMS (uM)	Concentração colchicina (ug/ml)	Tempo de colchicina (min)	Tempo de KCl	Quantidade	Qualidade
48	0,5	0	0,066	30	20	Ruim	Ruim
48	0,5	0	0,066	30	20	Ruim	Ruim
48	0,5	0	0,066	60	20	Ruim	Ruim
48	0,5	0	0,066	60	20	Ruim	Ruim
48	1	0	0,165	60	30	Ruim	Razoável
48	1	0	0,165	60	30	Razoável	Razoável
48	1	0	0,165	60	30	Razoável	Razoável
48	1	0	0,165	60	30	Bom	Razoável
48	1	160	0,165	60	30	Ruim	Razoável
48	1	160	0,165	60	30	Bom	Razoável
72	0,5	0	0,033	60	20	Bom	Razoável
72	0,5	0	0,033	60	20	Ruim	Razoável
72	0,5	0	0,066	60	20	Bom	Razoável
72	0,5	0	0,066	60	20	Bom	Razoável
72	0,5	0	0,165	60	20	Bom	Razoável
72	0,5	0	0,165	60	20	Bom	Razoável
72	1	0	0,165	60	30	Bom	Razoável
72	1	0	0,165	60	30	Bom	Bom
72	1	80	0,165	60	30	Bom	Bom
72	1	80	0,165	60	30	Bom	Razoável
72	1	160	0,165	60	30	Bom	Razoável
72	1	160	0,165	60	30	Bom	Bom

Legendas: MMS = Metil Metano Sulfonato; KCl = Cloreto de Potássio.

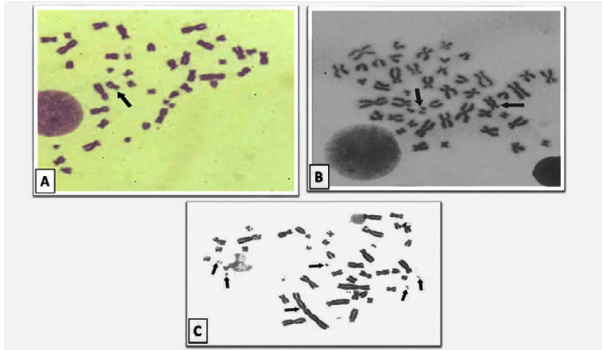


Figura 3. Imagem de metáfases apresentando alterações (indicadas pelas setas) observadas nas amostras do controle positivo: (A) quebra cromatídica; (B) cromossomo dicêntrico e fragmento acêntrico; (C) cromossomo quadricêntrico com fragmentos acêntrico e minutos
Nota: Imagens obtidas do Sistema de Captura e Análise GeneAll.

como a OECD⁶, e em normas nacionais de qualidade laboratorial⁷, favorecendo a reprodutibilidade analítica, ao mesmo tempo em que permitiu comparação com estudos conduzidos em diferentes centros de pesquisa.

O estudo-piloto demonstrou sensibilidade da técnica para a detecção de aberrações induzidas, evidenciada pela presença de alterações cromossômicas estruturais, como separação centromérica, falha cromatídica, quebra cromatídica, cromossomo dicêntrico com fragmento acêntrico, um possível cromossomo quadricêntrico e minutos, nas culturas tratadas com MMS, confirmando sua adequação como ferramenta de controle positivo aplicada na padronização da técnica. Esses achados corroboram a literatura, que descreve o MMS como um agente um indutor de danos cromossômicos^{6,16}.

Os resultados demonstram que o tempo de cultivo influenciou diretamente na qualidade das preparações, especialmente nas culturas tratadas com MMS. O período de 48 horas mostrou ser insuficiente para garantir adequada progressão celular, possivelmente porque muitas células ainda se encontravam na primeira mitose, resultando em um menor número de metáfases e comprometendo a qualidade da análise, além de a exposição ao MMS interferir na dinâmica do ciclo celular, reduzindo a frequência de células com esse tempo de divisão. Em contrapartida, o cultivo de 72 horas apresentou-se mais adequado para as culturas, pois representa um ciclo e meio de divisão em linfócitos que apresentam divisão celular não sincronizadas.

A avaliação dos diferentes tempos de cultivo contribuiu para a otimização do protocolo, sendo o período de 72 horas de cultivo o que apresentou melhor desempenho citogenético e foi definido como padrão para os controles positivos. As culturas que mantiveram os tempos de 48 e 72 horas para os controles negativos ampliam a flexibilidade metodológica e a aplicabilidade da técnica a distintos desenhos experimentais. A incorporação da

técnica de bandeamento G como método complementar auxiliou a caracterização das alterações e a confirmação de alterações constitucionais, aumentando a robustez interpretativa dos resultados.

Este estudo apresenta limitações relacionadas ao seu caráter piloto predominantemente metodológico. O tamanho amostral reduzido restringiu a realização de análises estatísticas e a generalização dos achados e comparações experimentais mais robustas, especialmente em virtude da qualidade limitada das metáfases observadas nas culturas tratadas com MMS no período de 48 horas. Consequentemente, a interpretação dos dados foi baseada em critérios descritivos quantitativos, como o índice mitótico, e qualitativos, como a integridade das metáfases e a morfologia dos cromossomos. Nessa etapa de implementação, os controles negativos foram utilizados exclusivamente como referência qualitativa para o monitoramento da viabilidade das culturas. Contudo tais limitações não invalidam o estudo, visto que os resultados obtidos foram suficientes para implementar a técnica e consolidar um protocolo padronizado e reprodutível.

No contexto da vigilância em saúde, a consolidação do teste de aberrações cromossômicas no LabTox reforça o biomonitoramento genético como ferramenta preditiva, dada a associação entre a frequência de aberrações cromossômicas e o risco de desenvolvimento de neoplasias^{17,18}. A elaboração de um protocolo operacional padrão e a implementação da técnica não apenas harmonizam a metodologia interna, mas também qualificam o LabTox para futuras aplicações em populações ocupacionalmente expostas. A integração desse ensaio com outros biomarcadores e análise de variáveis individuais poderão ampliar a compreensão dos riscos em saúde coletiva.

Esses resultados corroboram a literatura, que destaca a relevância do teste de aberrações cromossômicas como um biomarcador clássico na avaliação de exposição a agentes genotóxicos em estudos de biomonitoramento humano. A correta padronização das condições experimentais, incluindo tempo de cultura e uso de controles adequados, pode garantir a comparabilidade dos resultados entre diferentes laboratórios.

Desse modo, a implementação do teste de aberrações cromossômicas, no LabTox, aliada à elaboração de um protocolo operacional padrão, representa um avanço significativo para a harmonização metodológica e a geração de dados científicos, ampliando seu potencial de aplicação em programas de biomonitoramento genético e contribuindo para a avaliação precoce de riscos ocupacionais e o desenvolvimento de estratégias de prevenção e proteção da saúde dos trabalhadores.

CONCLUSÃO

A consolidação da implementação do teste de aberrações cromossômicas no LabTox juntamente com o desenvolvimento de um protocolo operacional padrão contribuíram para a padronização e reprodutibilidade da técnica, fortalecendo a confiabilidade dos resultados obtidos para favorecer a harmonização metodológica com outros centros de pesquisa, pois se trata de uma ferramenta que possui potencial para contribuir diretamente para a geração de dados científicos relevantes que poderão subsidiar intervenções voltadas à proteção da saúde dos trabalhadores. Além disso, a implementação da técnica permite a integração desse biomarcador aos programas de biomonitoramento genético como uma ferramenta promissora para a orientação de medidas preventivas e a avaliação da eficácia de ações de controle em populações ocupacionalmente expostas a agentes genotóxicos.

Embora o estudo apresente limitações relacionadas ao caráter piloto e ao tamanho amostral reduzido, os resultados obtidos permitiram a padronização do protocolo, demonstrando que a técnica está apta para análises futuras com maior robustez.

Dessa forma, este estudo evidencia a importância da incorporação de mais uma técnica de avaliação de dano genotóxico que, associada a outras metodologias já implantadas, potencializa o LabTox na interface entre a pesquisa aplicada, a toxicologia e a saúde do trabalhador.

AGRADECIMENTOS

Às alunas de Iniciação Científica, Lohane Oliveira Marins e Jasmiyn Braga Anchete, pelo comprometimento demonstrado no processo de aprendizagem e pelas contribuições prestadas nas etapas experimentais. Ao aluno de Iniciação Científica, Phrancys Alberto, pelo empenho na elaboração e ajustes das imagens deste artigo.

CONTRIBUIÇÕES

Ana Paula Castilho contribuiu na concepção e no planejamento do estudo; na análise e interpretação dos dados; na redação e revisão crítica. Katia Soares da Poça contribuiu na análise e interpretação dos dados; e na revisão crítica. Maria Theresa de Souza Accioly Martins contribuiu no desenho do trabalho; e na revisão crítica. Márcia Sarpa de Campos Mello contribuiu na redação e revisão crítica. Todas as autoras aprovaram a versão final a ser publicada.

DECLARAÇÃO DE CONFLITOS DE INTERESSE

Nada a declarar.

DECLARAÇÃO DE DISPONIBILIDADE DE DADOS

Os dados que suportam os achados deste estudo estão disponíveis mediante solicitação ao autor correspondente.

FONTES DE FINANCIAMENTO

A implementação desta técnica recebeu financiamento do Ministério Público do Trabalho do Rio de Janeiro (MPT-RJ) para a aquisição de alguns equipamentos e insumos, administrado pelo Centro de Estudos, Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico em Saúde Coletiva (Cepesc).

REFERÊNCIAS

1. Collotta M, Bertazzi PA, Bollati V. Epigenetics and pesticides. *Toxicology*. 2013;307:35-41. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tox.2013.01.017>
2. Coelho PCS. Biomonitoring of environmental contamination resulting from mining activities on exposed populations [tese na internet]. Porto: Universidade do Porto; 2013 [acesso 2025 nov 2025]. Disponível em: <https://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/69814/2/30650.pdf>
3. Pedrosa TMA, Benvindo-Souza M, Nascimento FA, et al. Cancer and occupational exposure to pesticides: a bibliometric study of the past 10 years. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2022;29(12):17464-75. doi: <https://doi.org/10.1007/s11356-021-17031-2>
4. Valente D, Costa-Amaral IC, Carvalho LVB, 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 Saude Ocup*. 2017;42(Suppl 1):e2s. doi: <https://doi.org/10.1590/2317-6369000124415>
5. Maluf SW, Riegel M. Citogenética humana. 1 ed. Porto Alegre: Artmed; 2011.
6. Organisation for Economic Co-operation and Development [Internet]. Paris (FRA): OECD; 1961. Test nº 473: in vitro mammalian chromosomal aberration test.; 2016 [acesso 2025 jan 18]. Available from: https://www.oecd.org/en/publications/test-no-473-in-vitro-mammalian-chromosomal-aberration-test_9789264264649-en.html
7. Sociedade Brasileira de Patologia Clínica. Norma PALC 2025 [Internet]. Rio de Janeiro: SBPC; 2025 [acesso 2025 jan 18]. Disponível em: <https://bibliotecasbpc.org.br/pags/pgBoxAcervo.php?ID=3028>

8. International Atomic Energy Agency. Cytogenetic analysis for radiation dose assessment: a manual [Internet]. Vienna: IAEA; 2001 [acesso 2025 jul 07]. (Technical Reports Series 405). Disponível em: https://www-pub.iaea.org/MTCD/Publications/PDF/TRS405_scr.pdf
9. Santos DVS. Avaliação de aberrações cromossômicas em trabalhadores de postos de gasolina da Zona Oeste do Rio de Janeiro [dissertação na internet]. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca; 2015 [acesso 2025 mar 25]. Disponível em: <https://arca.fiocruz.br/items/4a39cd53-7d3d-4cae-96b2-1476b2a12c5a>
10. Moorhead PS, Nowell PC, Mellman WJ, et al. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp Cell Res*. 1960;20(3):613-16. doi: [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(60\)90138-5](https://doi.org/10.1016/0014-4827(60)90138-5)
11. Yunis JJ, Sanchez O. G-banding and chromosome structure. *Chromosoma*. 1973;44(1):15-23. doi: <https://doi.org/10.1007/BF00372570>
12. McGowan-Jordan J, Hastings RJ, Moore S, editors. ISCN 2020: an international system for human cytogenomic nomenclature 2020. Basel: S. Karger AG; 2020. doi: <https://doi.org/10.1159/000510090>
13. Metafer: In Vitro Diagnostic Medical Device [Internet]. Berlin; 1986. [acesso 2025 nov 30]. Disponível em: <https://metasystems-international.com/en/products/metafer/>
14. GeneALL [Internet]. Lisboa; 2020 [acesso 2025 nov 30]. Disponível em: <https://qualiterm.com.br/produto/geneall-cariotipos/>
15. Conselho Nacional de Saúde (BR). Resolução nº 466, de 12 de dezembro de 2012. Aprova as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos [Internet]. Diário Oficial da União, Brasília, DF. 2013 jun 13 [acesso 2025 mar 09]; Seção 1:59. Disponível em: <https://www.gov.br/conselho-nacional-de-saude/pt-br/atos-normativos/resolucoes/2012/resolucao-no-466.pdf/view>
16. Aydın G, Liman R. Cyto-genotoxic effects of pinoxaden on allium cepa L. roots. *J Appl Genet*. 2020;61(3):349-57. doi: <https://doi.org/10.1007/s13353-020-00560-w>
17. Heng E, Thanedar S, Heng HH. The importance of monitoring non-clonal chromosome aberrations (NCCAs) in cancer research. *Methods Mol Biol*. 2024;2825:79-111. doi: https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3946-7_4
18. Frias S, Ramos S, Salas C, et al. Nonclonal chromosome aberrations and genome chaos in somatic and germ cells from patients and survivors of Hodgkin lymphoma. *Genes (Basel)*. 2019;10(1):37. doi: <https://doi.org/10.3390/genes10010037>

Recebido em 25/1/2026

Aprovado em 10/6/2026

