

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

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

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

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

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

RESUMEN

Introducción: La exposición ocupacional a agentes químicos se asocia con daños genéticos y un mayor riesgo de enfermedades, incluido el cáncer. El biomonitoring 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 biomonitoring 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 bandeado 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 biomonitoring, proporcionando una herramienta confiable para la evaluación temprana de daños genéticos y prevención de riesgos ocupacionales.

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

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 metanosulfonato em duas concentrações). As lâminas foram preparadas e coradas com Giemsa, e quando necessário o bandejamento G, analisando-se 300 metafases 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.

¹⁻⁴Instituto 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>

Dirección para correspondencia: 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



INTRODUCCIÓN

Los efectos nocivos de los agentes químicos sobre la salud humana han sido ampliamente estudiados desde el siglo pasado, siendo una realidad presente especialmente en el contexto ocupacional, en el cual la exposición a sustancias mutagénicas y carcinogénicas representa un relevante problema de salud pública y del trabajador. Evidencias científicas señalan que la exposición ocupacional a estos agentes está asociada a un riesgo aumentado de desarrollo de diversas enfermedades, como disturbios neurológicos, alteraciones reproductivas y cáncer¹. La toxicidad de estos agentes depende de una serie de factores, incluyendo sus propiedades químicas inherentes, así como las interacciones químicas debido a la presencia de otros agentes que conforman la formulación de estos productos, incluyendo estabilizantes, solventes, impurezas, aditivos y pesticidas. Estos compuestos pueden causar daños genéticos, lo que representa un factor de gran relevancia para la salud pública, especialmente para la salud del trabajador, debido a la relación ya establecida entre la genotoxicidad y el desarrollo de cáncer.

En este contexto, el biomonitorio de individuos expuestos ha sido destacado como una herramienta esencial de evaluación en la vigilancia en salud, permitiendo la detección temprana de efectos biológicos adversos y ayudando a la implementación de medidas preventivas y correctivas en el ambiente de trabajo, como resultado de la exposición a sustancias químicas^{2,3}.

El potencial genotóxico de las sustancias químicas puede ser evaluado por medio de una variedad de ensayos relacionados con la toxicología genética, tales como la prueba del micronúcleo, ensayo cometa y la prueba de aberraciones cromosómicas, los cuales detectan daños en el ADN⁴.

Una de las consecuencias biológicas de la exposición humana a los agentes químicos es la inducción de alteraciones en los cromosomas, que son observadas por medio del uso de la metodología llamada aberraciones cromosómicas. El estudio de las aberraciones cromosómicas es una evaluación citogenética clásica, ampliamente validada y aceptada internacionalmente, que consiste en el análisis de los cromosomas obtenidos por cultivos de linfocitos humanos *in vitro*. Esta técnica es considerada como un importante biomarcador de efectos tempranos de carcinógenos genotóxicos en enfoques de exposición ambiental y ocupacional. Es esencial para comprender las alteraciones que pueden ocurrir en el material genético, y su complejidad reside en la necesidad de preparación adecuada de las muestras, en la coloración específica de los cromosomas y en la interpretación juiciosa de los resultados.

Una de las ventajas de evaluar los linfocitos humanos es el hecho de que ellos circulan por todo el organismo⁵, lo que los expone a cualquier agente mutagénico, independientemente de la vía de introducción del agente en el organismo, sea por vía oral, inhalatoria o dérmica.

Las aberraciones cromosómicas se dividen en dos tipos: alteraciones numéricas y alteraciones estructurales. Las alteraciones numéricas se caracterizan por la modificación del número de cromosomas, pudiendo haber pérdidas o ganancias, diferente del número diploide ($2n=46$ cromosomas). Ya las alteraciones estructurales se caracterizan por modificaciones en la estructura de los cromosomas y son llamadas de alteraciones cromosómicas cuando ocurren simultáneamente en las dos cromátidas, o alteraciones cromatídicas cuando involucran a una sola cromátida.

Evidencias indican una correlación positiva entre el aumento de la frecuencia de aberraciones cromosómicas en linfocitos y el riesgo de desarrollo de enfermedades, como las neoplasias⁵, lo que refuerza la relevancia del uso de estos biomarcadores en programas de biomonitorio ocupacional.

El Laboratorio de Toxicología Ocupacional, Ambiental y Vigilancia del Cáncer (LabTox) desarrolla proyectos de investigación orientados a la salud del trabajador, evaluando la exposición ocupacional a agentes potencialmente mutagénicos y carcinogénicos. En este contexto, la implementación de la técnica de aberraciones cromosómicas representa una importante ampliación de las metodologías de toxicología genética ya empleadas en el laboratorio para evaluación de daños en el ADN, posibilitando análisis complementarios y, de esta forma, contribuyendo a la mayor robustez interpretativa de los resultados, además de fortalecer la precisión metodológica y la reproductibilidad analítica en futuros proyectos de investigación en biomonitorio desarrollados en el LabTox.

Ante la importancia de este biomarcador, el presente estudio tiene como objetivo no solo implementar la prueba de aberraciones cromosómicas en el LabTox para aplicación en biomonitorio de trabajadores expuestos a agentes mutagénicos, carcinogénicos y/o potencialmente carcinogénicos, con la propuesta de evaluar los potenciales riesgos a la salud, en proyectos de investigación aprobados por el Comité de Ética en Pesquisa (CEP) del Instituto Nacional del Cáncer (INCA), sino también integrarla a las demás metodologías ya implantadas en el laboratorio, ampliando, así, el alcance y la robustez de los resultados obtenidos.

MÉTODO

Para la implementación de la técnica y elaboración del protocolo operativo estándar de la prueba de aberraciones cromosómicas, fue realizada una amplia revisión bibliográfica sobre el tema, alineada a la experiencia técnica acumulada

a lo largo de años de la profesional responsable por la ejecución e interpretación de la prueba de aberraciones cromosómicas. En todas las etapas, los procedimientos adoptados fueron guiados por directrices internacionales (OCDE)⁶, así como por los requisitos de la Norma PALC – Programa de Acreditación de Laboratorios Clínicos⁷, garantizando conformidad con las recomendaciones de la literatura científica y con buenas prácticas laborales consolidadas en la rutina del laboratorio.

De esta forma, el protocolo operativo estándar fue elaborado con la descripción detallada de cada etapa de la rutina operativa y experimental adoptada en la prueba.

Para el estudio piloto fueron evaluados dos grupos: (1) grupo control negativo, compuesto por muestras de sangre periférica de voluntarios clínicamente saludables, sin antecedentes de exposición ocupacional a agentes químicos; (2) grupo control positivo, constituido por muestras de sangre periférica de voluntarios en las mismas condiciones del grupo control negativo con la adición del agente mutagénico metanosulfonato de metilo (MMS – Sigma®), en diferentes concentraciones al cultivo celular, para la inducción de alteraciones cromosómicas *in vitro*.

Las muestras de sangre periférica fueron recolectadas en tubos con heparina y acondicionadas bajo refrigeración (2 a 4 °C) hasta el procesamiento. Los cultivos de linfocitos fueron preparados en tubo Falcon de 15 ml conteniendo 5 ml de medio PB-MAX (Gibco®), un medio comercial listo para cariotipo, compuesto por RPMI, enriquecido con Suero Fetal Bovino (SFB), suplementado con fitohemaglutinina (PHA) y 1,0 ml de sangre total, llevados a una incubadora de CO₂, (5%) a 37 °C.

Los cultivos de las muestras pertenecientes al grupo control negativo fueron representados por dos voluntarios, y considerados dos tiempos distintos de cultivo: 48 y 72 horas. Para el grupo control positivo, los cultivos fueron representados por cuatro voluntarios, con los mismos tiempos de cultivo. El agente mutagénico MMS fue adicionado a los cultivos tras 24 horas (en los cultivos de 48) y tras 48 horas (en los cultivos de 72), garantizando exposición de 24 horas al agente. Fueron probadas dos concentraciones distintas: 80 µM y 160 µM, según las guías de la OCDE, y de acuerdo con la literatura especializada^{8,9}, con el objetivo de identificar el intervalo experimental que proporcionase mejor rendimiento celular y de seleccionar la condición que presentase el efecto citogenético deseado para la definición del protocolo del ensayo.

Pasado el período de incubación, 48 o 72 horas variando entre más o menos una hora antes o después, fueron adicionados 0,165 µg/ml de colchicina (Sigma®) en todas las muestras con el objetivo de interrumpir la formación del huso mitótico y bloquear la división celular en metafase. A continuación, los cultivos fueron nuevamente incubados por una hora más a 37 °C.

Al final de ese período, los tubos fueron centrifugados a 1500 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante fue retirado e, inmediatamente, fueron adicionados 10 ml de solución hipotónica, (KCl 0,075 M), homogeneizados y mantenidos a 37 °C al baño maría por 30 minutos.

Después de ese tiempo, los tubos fueron nuevamente centrifugados, el sobrenadante fue retirado y se inició la etapa de fijación, en la cual fueron adicionados 10 ml de fijador recién preparado y refrigerado (solución de Carnoy; metanol y ácido acético, ambos de Merck en la proporción 3:1), con dos etapas más sucesivas de lavado con fijador, dejando el *pellet* cada vez más limpio, en las cuales fueron adicionados 5 ml de fijador en cada una, seguidas de centrifugación.

Después de las etapas de lavado y de la última centrifugación, aproximadamente 0,5 ml del fijador fue mantenido junto con el sedimento celular (*pellet*), siendo la suspensión homogeneizada para la preparación de las láminas. Estas fueron confeccionadas mediante la técnica de goteo de la suspensión celular y dispuestas en placa calentada a 50 °C, por 10 a 15 minutos, o mantenidas a temperatura ambiente para secado. En promedio, se prepararon de dos a cuatro láminas por participante.

Para el teñido de las láminas, fue preparada una solución de Giemsa al 5% diluida en tampón fosfato salino (PBS), en un frasco de Coplin, donde las láminas fueron dispuestas y mantenidas por cinco minutos, lavadas en agua corriente, y el proceso de secado se dio a temperatura ambiente.

La Figura 1 muestra de forma esquemática todas las etapas necesarias para la realización de la prueba de aberraciones cromosómicas.

Toda la técnica se basó en el método originalmente desarrollado¹⁰, con las debidas modificaciones y adaptaciones. Antes de la estandarización definitiva del protocolo operativo estándar, fueron realizadas pruebas con los controles negativos y positivos, seguidas de ajustes para mejorar la calidad y cantidad de las células. Estos ajustes incluyeron: (1) aumento del volumen de sangre de 0,5 ml a 1,0 ml por cultivo, para elevar la densidad leucocitaria; (2) optimización del bloqueo mitótico con colchicina mediante el ajuste de la concentración a 0,165 µg/ml, tras diferentes pruebas (intervalo probado de 0,033 a 0,165 µg/ml), con tiempo de exposición para 60 minutos (probado de 30 a 60 minutos), garantizando un índice mitótico satisfactorio, sin comprometer la morfología cromosómica; (3) estandarización del tratamiento hipotónico (KCl 0,075 M) por 30 minutos (probado de 20 a 30 minutos), favoreciendo la dispersión cromosómica; (4) ajuste de la velocidad de centrifugación a 1500 rpm (probado entre 1500 y 1800 rpm) para asegurar la integridad del *pellet*. Tales adaptaciones fueron fundamentales para la adecuación del protocolo,

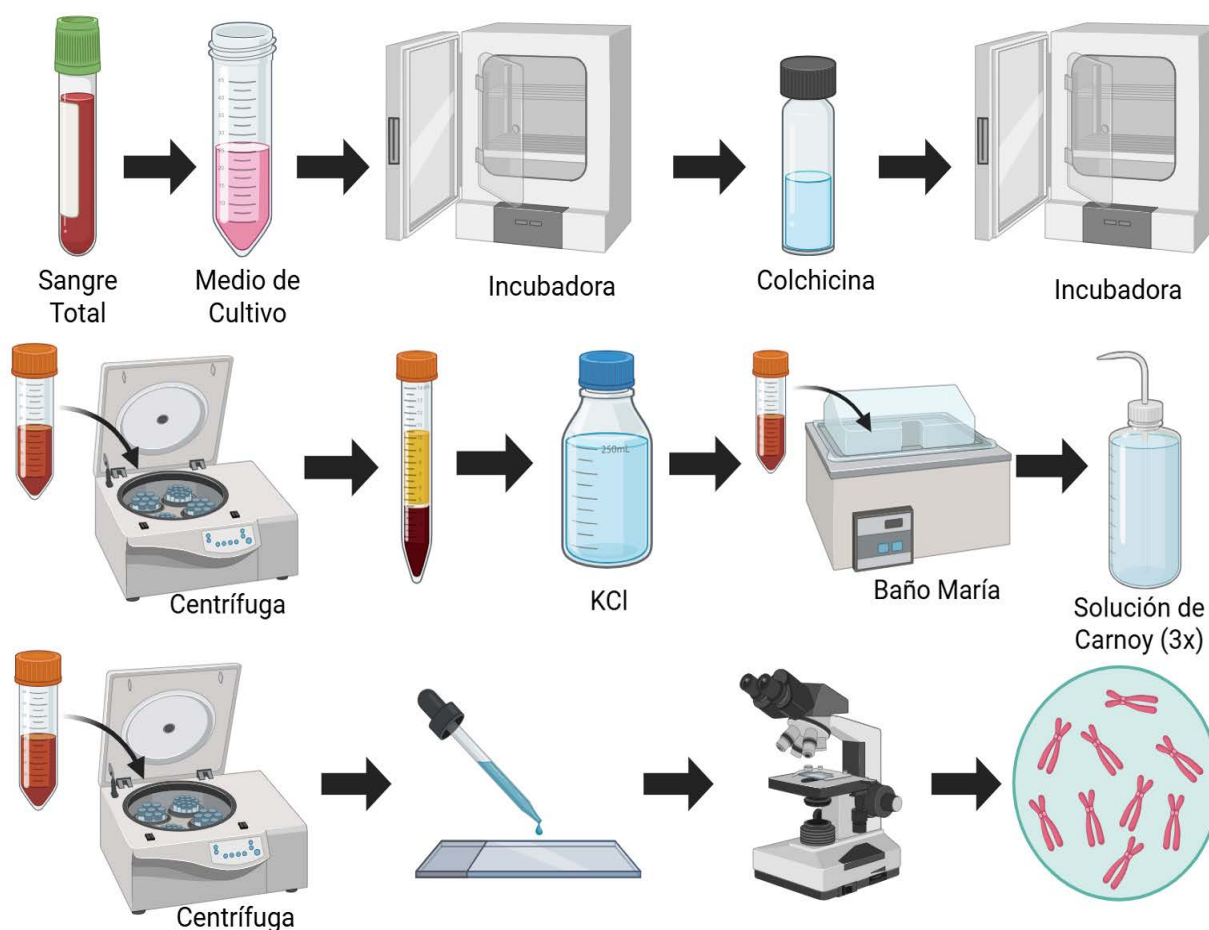


Figura 1. Flujograma de la prueba de aberraciones cromosómicas, mostrando todas las etapas
Nota: Imagen confeccionada con base en el método descrito usando programa BioRender.

resultando en mayor preservación de la integridad estructural de los cromosomas, esencial para la eficiencia en la detección de daños genotóxicos.

Las láminas fueron analizadas en microscopio óptico con el objetivo de evaluar la calidad del material, por medio del tamizaje de la frecuencia de metafases y de la morfología de los cromosomas, además de verificar la concentración de la suspensión celular (Figura 2). El índice mitótico fue evaluado mediante el conteo del número de metafases encontradas en 1000 linfocitos observados.

Además de la tinción convencional, se probó también la técnica de bandeo G, de acuerdo con el método original¹¹, con modificaciones. La técnica consiste en el tratamiento de los cromosomas con tripsina, cuya función es desnaturalizar las proteínas de los cromosomas, digiriendo parcialmente las regiones cromosómicas, presentando así dos patrones de bandas: las regiones heterocromáticas, que tienden a ser ricas en adenina y timina (AT) y que producen un patrón de bandas más oscuras; y las regiones de eucromatina, que tienden a ser ricas en guanina y citosina (GC), incorporan menos Giemsa y forman bandas claras (Figura 2B). Para la

realización del bandeo, las láminas fueron sometidas al proceso de envejecimiento por períodos que variaron entre dos y cuatro horas en placa calentada a 50 °C, 24 horas en estufa a 37 °C o 72 horas en temperatura ambiente. Vale recordar que las condiciones ideales para el bandeo pueden variar significativamente en función de diversos factores, como temperatura y humedad del ambiente, tiempo de cultivo, calidad de las láminas, entre otros.

Para el bandeo se preparó la solución de tripsina (Sigma®), 0,10 g, disuelta en 100 ml de tampón Dulbecco y calentada a 37 °C. Las láminas fueron sometidas a

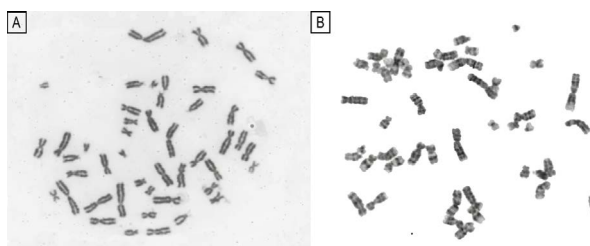


Figura 2. Imagen de cromosomas humanos en metafase, sin alteraciones (cultivo de linfocitos): (A) Cromosomas en coloración convencional; (B) Cromosomas - Con banda G
Nota: Imágenes obtenidas por el Sistema de Análisis Metafer.

tripsinización en frasco de Coplin por períodos de 5 a 60 segundos, con tiempo de exposición proporcional al período y la condición del envejecimiento. A continuación, fueron bañadas con solución fisiológica y, finalmente, fueron teñidas con Giemsa al 5% por cinco minutos, lavadas con agua corriente y mantenidas a temperatura ambiente para secado.

Las láminas fueron inicialmente analizadas al microscopio óptico, el índice mitótico fue evaluado y se realizó el conteo de 300 metafases en coloración convencional (conforme con la recomendación de la OCDE), considerando solo las células con 44 a 46 cromosomas o más. Las muestras que necesitaron ser evaluadas por cariotipo, con el objetivo de confirmar alteraciones constitucionales, fueron sometidas a la técnica de bandeado G, lo que permitió un mejor análisis de las alteraciones y la identificación de los cromosomas involucrados. Cuando se consideró necesario, fueron cariotipadas 20 metafases por individuo de acuerdo con normas de calidad, y el resultado fue descrito según la *International System for Human Cytogenomic Nomenclature* (ISCN)¹².

Vale resaltar que la identificación del cariotipo se realiza exclusivamente después del bandeado G, que permite un análisis minucioso con la distinción de los pares de los cromosomas autosómicos y sexuales, además de la detección de alteraciones más sutiles como deleciones, inversiones, duplicaciones entre otras. Todos los análisis fueron realizados por dos o más analistas capacitados, o sea, siempre con doble verificación y revisados siempre que fue necesario, conforme con las recomendaciones de normas de calidad.

Las células observadas con aberraciones cromosómicas fueron registradas en tabla y clasificadas por tipos y cantidad de alteraciones. Las alteraciones incluyeron translocaciones, rupturas y fallas cromatídicas, entre otras. Esta categorización facilitó el análisis estadístico.

Para optimizar los análisis y la construcción de los cariotipos, además del conteo manual en microscopio, las láminas también fueron evaluadas por medio de sistema de análisis integrado a la captura de imágenes, equipado con herramientas de edición. Fueron utilizados el sistema semiautomatizado *Metafer*¹³ (*software* de la empresa *MetaSystems*) y el sistema manual *GeneALL*¹⁴ (*OutSet*).

El estudio piloto fue realizado con una muestra de conveniencia compuesta por seis voluntarias, trabajadoras del propio laboratorio, de sexo femenino, con grupo etario entre 21 y 31 años, las cuales fueron informadas que las muestras de sangre serían utilizadas exclusivamente para fines de control interno y estandarización de la metodología. Tales muestras fueron aleatoriamente distribuidas en grupos de dos voluntarias para cada condición experimental, buscando la optimización de variables y la estandarización del protocolo a ser utilizado

en el laboratorio. Las voluntarias fueron preguntadas sobre la exposición a radiación ionizante (rayos X, tomografía computarizada, densitometría ósea, cintilografía y mamografía), pues son variables de confusión para el efecto genotóxico a ser verificado en el ensayo.

Las pruebas realizadas en este estudio permitieron implementar y estandarizar la técnica de aberraciones cromosómicas para ser utilizada en proyectos de investigación que evalúan la exposición ocupacional a agentes químicos en el ambiente de trabajo. El estudio fue previamente aprobado por el CEP/INCA con el número de parecer 2.983.493 (CAAE: 64799217.3.0000.5274), vinculado al proyecto “Investigación de los efectos tóxicos sobre la salud de trabajadores del municipio de Casimiro de Abreu (RJ) expuestos a pesticidas”, que incluía la técnica de aberraciones cromosómicas, en conformidad con los aspectos éticos relativos a la investigación con seres humanos, según la Resolución n.º. 466/12¹⁵ del Consejo Nacional de Salud.

RESULTADOS

El análisis microscópico de las muestras permitió la clasificación de las metafases y de los cromosomas con base en parámetros descritos en la literatura citogenética, como el número de metafases obtenidas, integridad y morfología cromosómica, grado de dispersión y superposición de los cromosomas (Cuadro 1).

Cuadro 1. Clasificación de las condiciones de cultivo después de evaluación microscópica

Evaluación	Clasificación	Criterio
Cuantitativa	Buena	100 metafases o más por lámina
Cuantitativa	Razonable	Entre 50 y 100 metafases por lámina
Cuantitativa	Baja	Menos de 50 metafases por lámina
Cuantitativa	Insuficiente o ATM	Pocas o ausencia total de metafases
Cualitativa	Buena	Cromosomas íntegros, morfología nítida, buena dispersión y mínima superposición
Cualitativa	Razonable	Cromosomas poco condensados o muy dispersos, moderada superposición y citoplasma moderado
Cualitativa	Mala	Cromosomas aglomerados, exceso de condensación y mucho citoplasma

Leyenda: ATM = Ausencia Total de Metafases.



Las diferentes condiciones de cultivo utilizadas para la optimización y la estandarización de la técnica de aberraciones cromosómicas están detalladas en la Tabla 1. Las muestras fueron distribuidas de forma aleatoria en grupos de dos voluntarios para cada condición experimental, considerando variaciones en el tiempo de cultivo, volumen de sangre, concentración de MMS, concentración y tiempo de exposición de la colchicina, además del tiempo de hipotonización con KCl.

Los resultados muestran que cultivos de 48 horas comparados con los de 72 horas tuvieron bajo rendimiento en las diferentes condiciones experimentales, sea para muestras consideradas control positivo o incluso control negativo, como puede observarse en la Tabla 1.

Al evaluar específicamente los cultivos tratados con el agente MMS, utilizados como control positivo, el tiempo de cultivo de 48 horas no presentó resultados satisfactorios, evidenciando bajo índice mitótico y metafases con cromosomas con baja calidad. Por este motivo, este tiempo de cultivo fue descartado para los

controles positivos, manteniéndose solamente el tiempo de 72 horas con las concentraciones de MMS determinadas. En contrapartida, los cultivos no tratados con MMS (controles negativos) presentaron resultados satisfactorios, en ambos tiempos de cultivo (48 y 72 h). Así, los dos períodos fueron establecidos como estándar. Todas los cultivos fueron identificados como C1 para el tiempo de 48 horas, mientras que, para el tiempo de 72 horas de cultivo, fueron identificados como C2.

La evaluación microscópica de los cromosomas metafásicos de muestras tratadas con el control positivo MMS mostró presencia de las alteraciones estructurales como: ruptura cromatídica (5,5%, n=2), cromosoma dicéntrico (5,5%, n=2), fragmento acéntrico (16,6%, n=6), minutos cromosómicos (25%, n=9), separación centromérica (11,1%, n=4), translocación (8,3%, n=3), brecha cromatídica (25%, n=9), cromosoma cuatricéntrico (2,7%, n=1), comprobando la sensibilidad del método para la detección de daños inducidos (Figura 3).

Tabla 1. Caracterización de las diferentes variables utilizadas

Tiempo de cultivo (h)	Volumen de sangre (ml)	Concentración MMS (uM)	Concentración colchicina (ug/ml)	Tiempo de colchicina (min)	Tiempo de KCl	Cantidad	Calidad
48	0,5	0	0,066	30	20	Mala	Mala
48	0,5	0	0,066	30	20	Mala	Mala
48	0,5	0	0,066	60	20	Mala	Mala
48	0,5	0	0,066	60	20	Mala	Mala
48	1	0	0,165	60	30	Mala	Razonable
48	1	0	0,165	60	30	Razonable	Razonable
48	1	0	0,165	60	30	Razonable	Razonable
48	1	0	0,165	60	30	Buena	Razonable
48	1	160	0,165	60	30	Mala	Razonable
48	1	160	0,165	60	30	Buena	Razonable
72	0,5	0	0,033	60	20	Buena	Razonable
72	0,5	0	0,033	60	20	Mala	Razonable
72	0,5	0	0,066	60	20	Buena	Razonable
72	0,5	0	0,066	60	20	Buena	Razonable
72	0,5	0	0,165	60	20	Buena	Razonable
72	0,5	0	0,165	60	20	Buena	Razonable
72	1	0	0,165	60	30	Buena	Razonable
72	1	0	0,165	60	30	Buena	Buena
72	1	80	0,165	60	30	Buena	Buena
72	1	80	0,165	60	30	Buena	Razonable
72	1	160	0,165	60	30	Buena	Razonable
72	1	160	0,165	60	30	Buena	Buena

Leyenda: MMS = Metanosulfonato de metilo; KCl = Cloruro de potasio.

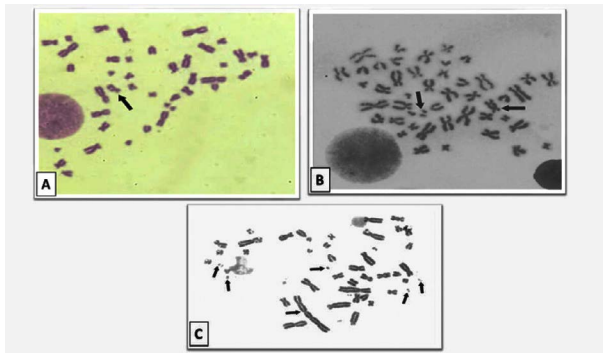


Figura 3. Imagen de metafases presentando alteraciones (indicadas por las flechas) observadas en las muestras del control positivo: (A) ruptura cromatídica; (B) cromosoma dicéntrico y fragmento acéntrico; (C) cromosoma cuatricéntrico con fragmentos acéntrico y minutos

Nota: Imágenes obtenidas del Sistema de Captura y Análisis GeneAll.

DISCUSIÓN

La implementación de la prueba de aberraciones cromosómicas en el LabTox posibilitó la consolidación de un protocolo estandarizado, fundamentado en directrices internacionales, como la OCDE⁶, y en normas nacionales de calidad laboratorial⁷, favoreciendo la reproductibilidad analítica, al mismo tiempo que permitió la comparación con estudios realizados en diferentes centros de investigación.

El estudio piloto demostró sensibilidad de la técnica para la detección de aberraciones inducidas, evidenciada por la presencia de alteraciones cromosómicas estructurales, como separación centromérica, brecha cromatídica, ruptura cromatídica, cromosoma dicéntrico con fragmento acéntrico, un posible cromosoma cuatricéntrico y minutos, en las cultivos tratados con MMS, confirmando su adecuación como herramienta de control positivo aplicada en la estandarización de la técnica. Estos hallazgos corroboran la literatura, que describe al MMS como un agente inductor de daños cromosómicos^{6,16}.

Los resultados demuestran que el tiempo de cultivo influyó directamente en la calidad de las preparaciones, especialmente en los cultivos tratados con MMS. El período de 48 horas reveló ser insuficiente para garantizar una adecuada progresión celular, posiblemente porque muchas células todavía se encontraban en la primera mitosis, resultando en un menor número de metafases y comprometiendo la calidad del análisis, además de que la exposición al MMS interfiere en la dinámica del ciclo celular, reduciendo la frecuencia de células con este tiempo de división. En contrapartida, el cultivo de 72 horas se evidenció como más adecuado para los cultivos, pues representa un ciclo y medio de división en linfocitos que presentan división celular no sincronizada.

La evaluación de los diferentes tiempos de cultivo contribuyó a la optimización del protocolo, siendo el período de 72 horas de cultivo el que presentó mejor desempeño citogenético y fue definido como estándar para los controles positivos. Los cultivos que mantuvieron los tiempos de 48 y 72 horas para los controles negativos amplían la flexibilidad metodológica y la aplicabilidad de la técnica a distintos diseños experimentales. La incorporación de la técnica de bandeo G como método complementario auxilió a la caracterización de las alteraciones y la confirmación de alteraciones constitucionales, aumentando la robustez interpretativa de los resultados.

Este estudio presenta limitaciones relacionadas con su carácter piloto predominantemente metodológico. El tamaño muestral reducido restringió la realización de análisis estadísticos y la generalización de los hallazgos y comparaciones experimentales más robustas, especialmente debido a la calidad limitada de las metafases observadas en los cultivos tratados con MMS en el período de 48 horas. En consecuencia, la interpretación de los datos se basó en criterios descriptivos cuantitativos, como el índice mitótico, y cualitativos, como la integridad de las metafases y la morfología de los cromosomas. En esta etapa de implementación, los controles negativos fueron utilizados exclusivamente como referencia cualitativa para el monitoreo de la viabilidad de los cultivos. No obstante, tales limitaciones no invalidan el estudio, dado que los resultados obtenidos fueron suficientes para implementar la técnica y consolidar un protocolo estandarizado y reproducible.

En el contexto de la vigilancia en salud, la consolidación de la prueba de aberraciones cromosómicas en el LabTox refuerza al biomonitoreo genético como una herramienta predictiva, dada la asociación entre la frecuencia de aberraciones cromosómicas y el riesgo de desarrollo de neoplasias^{17,18}. La elaboración de un protocolo operativo estándar y la implementación de la técnica no solo armonizan la metodología interna, sino también califican al LabTox para futuras aplicaciones en poblaciones ocupacionalmente expuestas. La integración de este ensayo con otros biomarcadores y análisis de variables individuales podrán ampliar la comprensión de los riesgos en salud colectiva.

Estos resultados corroboran la literatura, que destaca la relevancia de la prueba de aberraciones cromosómicas como un biomarcador clásico en la evaluación de exposición a agentes genotóxicos en estudios de biomonitoreo humano. La correcta estandarización de las condiciones experimentales, incluyendo tiempo de cultivo y uso de controles adecuados, puede garantizar la comparabilidad de los resultados entre diferentes laboratorios.

De este modo, la implementación de la prueba de aberraciones cromosómicas, en el LabTox, aliada a la elaboración de un protocolo operativo estándar, representa un avance significativo para la armonización metodológica y la generación de datos científicos, ampliando su potencial de aplicación en programas de biomonitoreo genético y contribuyendo a la evaluación temprana de riesgos ocupacionales y al desarrollo de estrategias de prevención y protección de la salud de los trabajadores.

CONCLUSIÓN

La consolidación de la implementación de la prueba de aberraciones cromosómicas en el LabTox junto con el desarrollo de un protocolo operativo estándar contribuyeron a la estandarización y reproducibilidad de la técnica, fortaleciendo la confiabilidad de los resultados obtenidos para favorecer la armonización metodológica con otros centros de investigación, pues se trata de una herramienta que tiene potencial para contribuir directamente a la generación de datos científicos relevantes que podrán dar bases a intervenciones orientadas a la protección de la salud de los trabajadores. Además, la implementación de la técnica permite la integración de ese biomarcador a los programas de biomonitoreo genético como una herramienta prometedora para la orientación de medidas preventivas y la evaluación de la eficacia de acciones de control en poblaciones ocupacionalmente expuestas a agentes genotóxicos.

Aunque el estudio presente limitaciones relacionadas con el carácter piloto y el tamaño muestral reducido, los resultados obtenidos permitieron la estandarización del protocolo, demostrando que la técnica está apta para análisis futuros con mayor robustez.

De esta forma, este estudio evidencia la importancia de la incorporación de una técnica más de evaluación de daño genotóxico que, asociada a otras metodologías ya implantadas, potencia al LabTox en la interfaz entre la investigación aplicada, la toxicología y la salud del trabajador.

AGRADECIMIENTOS

A las alumnas de Iniciación Científica, Lohane Oliveira Marins y Jasmiyn Braga Anchete, por el compromiso demostrado en el proceso de aprendizaje y por los aportes prestados en las etapas experimentales. Al alumno de Iniciación Científica, Phrancys Alberto, por el empeño en la elaboración y ajustes de las imágenes de este artículo.

APORTES

Ana Paula Castilho contribuyó a la concepción y la planificación del estudio; al análisis e interpretación de

los datos; a la redacción y revisión crítica. Katia Soares da Poça contribuyó al análisis e interpretación de los datos; y a la revisión crítica. Maria Theresa de Souza Accioly Martins contribuyó al diseño del trabajo; y a la revisión crítica. Márcia Sarpa de Campos Mello contribuyó a la redacción y revisión crítica. Todas las autoras aprobaron la versión final a publicarse.

DECLARACIÓN DE CONFLICTOS DE INTERÉS

Nada a declarar.

DECLARACIÓN DE DISPONIBILIDAD DE DATOS

Los datos que sustentan los hallazgos de este estudio están disponibles mediante solicitud al autor correspondiente.

FUENTES DE FINANCIAMIENTO

La implementación de esta técnica recibió financiamiento del Ministerio Público de Trabajo de Río de Janeiro (MPT-RJ) para la adquisición de algunos equipamientos e insumos, administrado por el Centro de Estudios, Investigación y Desarrollo Tecnológico en Salud Colectiva (Cepesc).

REFERENCIAS

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. Pedroso 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 [acceso 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 [acceso 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 [acceso 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 [acceso 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]. Berlim; 1986. [acceso 2025 nov 30]. Disponível em: <https://metasystems-international.com/en/products/metafer/>
14. GeneALL [Internet]. Lisboa; 2020 [acceso 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 [acceso 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

