



**REALIZAÇÃO DO TESTE DE MICRONÚCLEO, EM MUCOSA ORAL, PARA
AVALIAR O RISCO OCUPACIONAL EM FUMICULTORES EXPOSTO A
AGROQUÍMICOS**

Gabrieli Flesch da Silva¹
Jodel S. Alves²
Juliana da Silva³

Resumo

O Brasil é um dos maiores produtores de tabaco em todo o mundo; e o Rio Grande do Sul (RS) é o Estado com maior produtividade. A cultura do tabaco tem grande importância na atividade econômica e social no país, mas esta atividade requer extensa manipulação da planta do tabaco. A atividade expõe diretamente os produtores de tabaco à compostos orgânicos e inorgânicos, incluindo pesticidas e nicotina nas folhas de *Nicotiana tabacum*. O objetivo deste estudo foi detectar danos no DNA, em trabalhadores rurais, identificando morte celular, em células expostas a diferentes agentes, durante o período de colheita. Foi utilizado o teste de micronúcleo em Mucosa Oral em agricultores de Santa Cruz do Sul - RS. Um total de 137 indivíduos, sendo 77 agricultores (período de colheita) e 60 indivíduos controle (não expostos a folhas de tabaco ou outro tipo de agente) foram avaliados. O teste de Micronúcleos em Mucosa Oral avalia danos no DNA (micronúcleos e brotos nucleares), defeitos de citocinese (células binucleadas), e morte celular (células com cromatina condensada, cariorréticas, picnóticas e cariolíticas) no grupo dos agricultores, quando comparado com os indivíduos controle ($P < 0,001$, Mann-Whitney test). Com esses dados, até o momento, podemos concluir que a prática de colheita das folhas de tabaco provoca um aumento da instabilidade genética (danos genéticos) e morte celular. O cultivo requer grande manipulação da planta de tabaco e, conseqüentemente, os agricultores ficam expostos à uma mistura complexa de compostos. Nossos resultados indicam a necessidade de monitorar a toxicidade genética em trabalhadores rurais, expostos a pesticidas, bem como a necessidade de utilizar um equipamento de proteção adequado.

Palavras-chave: Micronúcleo; mucosa; agricultores; pesticidas.

INTRODUÇÃO

O uso de agrotóxicos tem aumentado globalmente nos últimos anos. Entre os grupos envolvidos na preparação e na distribuição final de misturas de pesticidas, os agricultores são comumente os indivíduos mais expostos (BOLOGNESI, 2003). Muitos desses pesticidas são classificados como "cancerígenos" pela Agência Internacional para Pesquisa sobre Câncer (IARC). Vários pesticidas que interagem com o DNA foram identificados como indutores de aborto, doenças degenerativas, doenças imunológicas, e cancro (Bolognesi 2003; Au *et al.*

¹ Aluna do curso de graduação de Biomedicina – Bolsista PIBIC/CNPq – gabiflesch@hotmail.com

² Aluno doutorando do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde.

³ Professor do curso de graduação de Ciências Biológicas e do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde – juliana.silva@ulbra.br

1999). Embora seja difícil estabelecer uma correlação entre a exposição a pesticidas e a prevalência de câncer, especialmente devido ao grande número de compostos envolvidos, alguns estudos sugerem uma maior prevalência de certos tipos de câncer em grupos populacionais expostos a pesticidas. Uma meta-análise mostrou que os agricultores estavam em risco de tumores específicos, incluindo leucemia e mieloma múltiplo (BOLOGNESI 2003; BOLOGNESI *et al.* 2011). Inúmeros relatórios sobre aberrações cromossômicas (CA AU *et al.* 1999; ZELJESIC; GARAJ-VRHOVAC, 2001), a troca de cromátides irmãs (SCE; SHAHAM *et al.*, 2001; ZELJESIC; GARAJ-VRHOVAC, 2002), micronúcleos (MN. FALCK *et al.*, 1999; SILVA *et al.*, 2008) e teste cometa (ZELJESIC; GARAJ-VRHOVAC, 2002; SILVA *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2008; GROVER *et al.*, 2003) foram observados aumentos significativos nestes biomarcadores após à exposição a pesticidas, fornecendo evidências sugestivas para os efeitos genotóxicos induzidos por esses produtos químicos. No entanto, as conclusões tiradas em relação ao dano genotóxico atribuída a estes pesticidas permanecem em conflito. Algumas investigações indicaram um aumento significativo de MN, SCE, e frequência de CA, enquanto outros não observaram diferenças significativas (GAUTHIER *et al.*, 2001; BOLOGNESI, 2003; BULL *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2012a; SILVA *et al.*, 2012b). As respostas encontradas nestes estudos dependeram predominantemente do tipo de pesticida utilizado, o período de exposição, bem como a utilização do equipamento de proteção pessoal. A fim de avaliar biomarcadores de exposição a pesticidas para o diagnóstico precoce da estabilidade celular, trabalhadores rurais expostos a pesticidas foram investigados pelo teste de frequência de micronúcleos em células de mucosa oral.

METODOLOGIA

Entre 2007 e 2008 foram coletadas amostras sanguíneas e bucais de 77 trabalhadores rurais em uma plantação de tabaco (coletadas durante os períodos de pico de aplicação de pesticidas), e 60 indivíduos não expostos a pesticidas da mesma região (grupo controle). Todos os indivíduos analisados foram convidados a preencher uma versão em Português de um questionário da Comissão Internacional para a Proteção contra Mutações Ambientais e Substâncias Cancerígenas (CARRANO; NATARAJAN, 1988), antes de serem convidados a participar de uma entrevista, que incluiu questões relacionadas a dados demográficos normais (por exemplo, idade, sexo), bem como questões médicas (exposição a raios-X, vacinas, medicamentos), estilo de vida (tabagismo, consumo de café e álcool, dieta), e ocupação (horas de trabalho/dia, tempo de exposição aos solventes orgânicos, utilização de equipamentos de proteção individual). O ensaio utilizado foi o Teste de micronúcleos (MN) em células de Mucosa Oral: Amostras de células de Mucosa Oral foram obtidas, coletando suavemente no interior da bochecha dos indivíduos (direita e esquerda) com uma cytobrush, posteriormente imersa em solução salina em um tubo Falcon, transportadas sob refrigeração ao laboratório. A solução foi centrifugada, posteriormente foi retirado o sobrenadante, e fixado em Carnoy. Foi feita a suspensão celular sobre a lâmina, e deixado secar ao ar. As lâminas foram coradas com solução Giemsa a 2%. Assim, foram analisadas 2000 células por indivíduo, 1000 célula em cada lâmina, e utilizadas para determinar a frequência de MN.

RESULTADOS

Os indivíduos foram classificados por sexo e idade, e divididos em fumantes e não-fumantes. O grupo não exposto consistiu de 60 indivíduos (38 homens e 22 mulheres; média de idade: 45,34±13,19 anos), sendo 15 indivíduos fumantes; o grupo exposto consistiu de 77 indivíduos (49 homens e 28 mulheres; média de idade: 44,27±12,44), sendo 20 indivíduos fumantes. A média de idade não diferiu significativamente entre os grupos, e cerca de 30% dos agricultores do sexo masculino, em cada grupo, eram fumantes. No grupo exposto, todos os

agricultores foram regularmente expostos (cerca de 2-3 vezes por semana) à misturas complexas de pesticidas, cuja composição depende das condições meteorológicas (~600h/ano). As atividades agrícolas foram realizadas principalmente em campos abertos, e a cultura principal era o tabaco. Como regra geral, os pesticidas foram aplicados sobre as plantas do tabaco a um nível acima da cabeça dos trabalhadores. Todos os agricultores expostos a pesticidas (100%) confirmaram que não tinham usado qualquer tipo de equipamento de proteção individual (luvas, máscaras de respiração, óculos de proteção, botes impermeáveis) durante a preparação ou aplicação dos pesticidas. Durante o período de exposição, todos os indivíduos apresentaram sintomas relacionados à intoxicação por agrotóxicos e tabaco, tais como dores de cabeça, dor abdominal, náuseas, e vômitos. Os resultados da análise citogenética são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Valores médios (média \pm desvio padrão) obtidos na análise citogenética em grupos não expostos e expostos.

Group (n)	MN
Não expostos (60)	1.33 \pm 1.86
Fumantes (15)	1.31 \pm 2.50
Não-fumantes (45)	1.32 \pm 1.65
Expostos (77)	7.14 \pm 6.49*
Fumantes (20)	5.22 \pm 5.64*
Não-fumantes (57)	7.73 \pm 6.66*

*Diferença significativa em comparação com o grupo controle (não exposto) at $P < 0.001$ (Mann Whitney-Test).

Não foram encontradas diferenças significativas entre homens e mulheres nos grupos não expostos ou expostos no Teste Micronúcleo [Não expostos: MN = 1.33 \pm 1.86 (homens: 1.42 \pm 1.72; mulheres 1.17 \pm 2.09); Expostos: MN = 7.14 \pm 6.49 (homens: 6.3 \pm 5.4; mulheres 8.6 \pm 7.9)]. Portanto, as amostras foram combinadas e divididas entre indivíduos expostos e não expostos. O grupo exposto apresentou aumento no número de MN, em células de Mucosa Oral, em relação ao grupo controle. Não foi observada diferença significativa entre fumantes e não-fumantes. Os pesticidas são uma categoria heterogênea de produtos químicos, especialmente projetados para controlar pragas, plantas daninhas, e doenças das plantas. O abuso ou mau uso desses pode levar a níveis significativos de exposição entre os profissionais expostos. Ambiente de trabalho, equipamentos de proteção individual, período e condições de exposição são descritos na literatura como fatores que podem afetar os níveis de danos citogenéticos (Bolognesi 2003). No presente estudo, os resultados do Teste de MN mostraram valores significativamente mais elevados para o grupo exposto em comparação com o grupo não exposto. Assim, este estudo demonstra um efeito genotóxico e mutagênico significativo devido à exposição a pesticidas em agricultores, o que corrobora com estudos anteriores. Os agricultores mais frequentemente expostos são aqueles que pulverizam os pesticidas. Em outro estudo do nosso grupo envolvendo fumicultores a partir da mesma região no Rio

Grande do Sul (Brasil), um aumento de dano ao DNA foi observado por vários biomarcadores biológicos precoces de exposição (Silva *et al.* 2012a; Silva *et al.* 2012b). Vale ressaltar que não houve diferenças observadas entre homens e mulheres pelo Teste MN nos grupos expostos e não expostos.

CONCLUSÃO

Nosso estudo demonstra a presença de efeitos genotóxicos em células de Mucosa Oral de agricultores expostos a pesticidas. Danos ao DNA podem ser consequência de dano oxidativo, resultantes da exposição a misturas de pesticidas e complexos contendo metais. É importante ressaltar que as medidas de proteção, a realização de um biomonitoramento, e uma avaliação de risco dos agricultores que utilizam pesticidas, é essencial para evitar riscos à saúde a longo prazo, que podem levar ao desenvolvimento de câncer e outras doenças degenerativas.

REFERÊNCIAS

- BOLOGNESI, C. Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. **Mutation Reserch**, v. 543. p. 251-272, 2003.
- BOLOGNESI, C. et al. Micronuclei and pesticide exposure. **Mutagenesis**, v. 26. p. 19-26, 2011.
- BONASSI, S. et al. The human MicroNucleus project on exfoliated buccal cells (HUMNXL): The role of life-style, host factors, occupation exposures, health status, and assay protocol. **Mutation Reserch**, v. 728. P. 88-97, 2011.
- BUCLEY, J.D. et al. Pesticide exposures in children with non-Hodgkin lymphoma. **Cancer**, v. 89. p. 2315-2321, 2000.
- BULL, S. et al. Evidence for genotoxicity of pesticides in pesticide applicators: a review. **Mutagenesis**, v. 21. p. 93-103, 2006.
- CARRANO, A.V.; NATARAJAN, A.T. International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens. ICPEMC publication no. 14. Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. **Mutation Reserch**, v. 204. p. 379-406, 1988.
- DA SILVA, F.R. et al. Genotoxic biomonitoring of tobacco farmers: Biomarkers of exposure, of early biological effects and of susceptibility. **Journal of Hazardous Materials**, v. 225-226. p. 81-90, 2012a.
- DA SILVA, F.R. et al. Application of the buccal micronucleus cytome assay and analysis of PON1Gln192Arg and CYP2A6*9(-48T>G) polymorphisms in tobacco farmers. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 53. p. 525-534, 2012b.
- FALCK, G.C. et al. Micronuclei in blood lymphocytes and genetic polymorphism for GSTM1, GSTT1 and NAT2 in pesticide-exposed greenhouse workers. **Mutation Reserch**, v. 441. p. 225-237, 1999.
- GAUTHIER, E. et al. Environmental pesticide exposure as a risk for Alzheimer's disease a case-control study, **Environmental Reserch**, v. 86. p. 37-45, 2001.
- GROVER, P. et al. Evaluation of genetic damage in workers employed in pesticide production

utilizing the comet assay. **Mutagenesis**, v. 18. p. 201-205, 2003.

HOLLAND, N. et al. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMAN project perspective on current status and knowledge gaps. **Mutation Research**, v. 659, p. 93-108, 2008.

VIDELA, L.A. et al. Oxidative stress-mediated hepatotoxicity of iron and copper: role of Kupffer cells. **BioMetals**, v. 16. p. 103-111, 2003.

ZELJEZIC, D. et al. Chromosomal aberration and single cell gel electrophoresis (comet) assay in the longitudinal risk assessment of occupational exposure to pesticides. **Mutagenesis**, v. 16. p. 359-363, 2001.

ZELJEZIC, D. et al. Sister chromatid exchange and proliferative rate index in the longitudinal risk assessment of occupational exposure to pesticides. **Chemosphere**. v. 46. p. 295-303, 2002.