



## AVALIAÇÃO DE DIFERENTES PARÂMETROS EM RELAÇÃO AO DANO AO DNA EM INDIVÍDUOS EXPOSTOS A AGROQUÍMICOS

Juliana Picinini<sup>1</sup>  
Vivian Kahl<sup>2</sup>  
Daniel Simon<sup>3</sup>  
Juliana da Silva<sup>3</sup>

### Resumo

O setor fumageiro exerce grande importância para a economia do país, entretanto, oferece riscos à saúde dos produtores agrícolas, pois requer uso de agroquímicos para proteger as lavouras. O objetivo do presente estudo foi analisar dados obtidos pelo teste CBMN (teste de micronúcleos por bloqueio de citocinese), avaliando a presença de células com NPB (ponte plasmática nuclear) e MN (micronúcleo) em indivíduos expostos (fumicultores) e controles, assim como os níveis de marcadores inflamatórios IL-6 (interleucina 6) e TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral alfa). Tais resultados foram correlacionados com a suscetibilidade individual dos grupos estudados de dois genes de reparo por excisão de base (BER): *OGGI* e *XRCCI*. Em relação aos fumicultores, quando comparados ao grupo controle, foi observado aumento significativo de NPB, o qual foi influenciado pelo alelo *OGGI Cys/-*. Fumicultores ainda apresentaram aumento significativo de MN e dos níveis séricos de IL-6 e TNF- $\alpha$ . Tais resultados salientam a importância de fazer-se um biomonitoramento desses fumicultores, e também da necessidade do uso de equipamentos de proteção individual (EPI) durante a manipulação dos agroquímicos e durante toda a safra.

Palavras chave: exposição ocupacional; marcadores inflamatórios; teste de micronúcleo; susceptibilidade.

### INTRODUÇÃO

O Brasil é o segundo maior produtor de tabaco no mundo, sendo essa cultura extremamente importante para a economia do país. A fim de proteger a lavoura do tabaco contra insetos e doenças, faz-se necessário o uso de agroquímicos (inseticidas, herbicidas, fungicidas e reguladores de crescimento de plantas) (DA SILVA et al., 2012). Os organofosforados, carbamatos e piretróides são as classes químicas mais utilizadas, as quais são aplicadas através de bombas costais durante toda a safra, que dura cerca de 10 meses. Além da falta de equipamento de proteção individual durante a aplicação destes produtos, outro agravante é a mistura destes químicos feita pelos agricultores, baseados em seus conhecimentos empíricos, e não observando as doses e recomendações dos fabricantes. Deste modo, os produtores agrícolas são expostos a concentrações baixas destes agentes químicos,

---

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

2 Aluna doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde. – Bolsista PROSUP/CAPES – vivian.kahl@gmail.com

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

mas de forma crônica (DA SILVA et al., 2014).

Entretanto, há poucas manifestações clínicas dos efeitos da exposição a longo prazo a baixas doses de agroquímicos, sendo difícil avaliá-los (BENEDETTI et al., 2013). Além disso, há uma relação entre exposição crônica a agroquímicos e a desregulação do processo inflamatório humano, podendo aumentar e/ou diminuir citocinas ou haver uma resposta proliferativa de linfócitos a agentes mitógenos (capazes de induzir mitose) (CORSINI et al., 2008). Ainda, a exposição ocupacional a agroquímicos oferece uma predisposição para diferentes tipos de câncer, alergias e doenças autoimunes (DHOUIB et al., 2016).

Danos cromossômicos em células binucleadas podem ser verificados através do ensaio CBMN (teste de Micronúcleo com Bloqueio de Citocinese) e são indicados, por exemplo, pela presença de micronúcleos (MN) e pontes plasmáticas nucleares (NPBs) (DA SILVA et al., 2012). Ainda, os indivíduos podem responder de maneiras diferentes à exposição exógena, de acordo com sua susceptibilidade genética, variando quanto à presença de processos de reparo do DNA. Portanto, verifica-se a importância de fazer-se um biomonitoramento destes produtores agrícolas, possibilitando prever e evitar o aparecimento de possíveis doenças futuras.

Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar os dados de MN e NPB e os resultados inflamatórios em grupos de indivíduos expostos a agroquímicos (fumicultores) e controles. A relação entre esses dados e a susceptibilidade individual quanto aos genes de reparo por excisão de base (BER) (*XRCC1* e *OGG1*) também foi abordada.

## METODOLOGIA

Este estudo foi aprovado pelo Comitê Nacional de Ética para Pesquisa - CONEP, Brasil (CAAE 35639814.5.0000.5349) e pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (2007835). Os participantes responderam à versão adaptada em língua portuguesa de um questionário da Comissão de Proteção contra Mutagênicos e Carcinógenos Ambientais e obteve-se um consentimento informado por escrito de cada indivíduo. Em uma entrevista pessoal, os indivíduos foram questionados sobre seus hábitos de vida, ocupação e questões médicas, além de seus dados demográficos. A população estudada foi composta por 220 indivíduos, 91 não expostos (idade média:  $73,0 \pm 12,6$  anos, 59% do sexo masculino) e 129 ocupacionalmente expostos a agroquímicos nos campos de fumo (idade média:  $42,7 \pm 13$  anos; 76% do sexo masculino). Os indivíduos expostos e não expostos foram selecionados nas cidades de Venâncio Aires, Santa Cruz do Sul, Sobradinho e Passo do Sobrado, no período de julho de 2008 a agosto de 2016. As amostras de células sanguíneas foram coletadas por punção venosa por profissional qualificado. O grupo controle foi composto por empregados de escritório e do comércio, não ocupacionalmente expostos a agroquímicos, e vivendo pelo menos a 15 km dos campos de tabaco.

Para o ensaio CBMN, culturas de sangue total foram realizadas em duplicata. As culturas foram incubadas a  $37^\circ\text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$ . A citocalasina-B foi adicionada a  $6,0\ \mu\text{g/mL}$  após 40 h de cultura e as células foram colhidas 24 h mais tarde por centrifugação em densidade com Ficoll para isolamento dos linfócitos. As células foram transferidas para lâminas por citocentrifugação e, em seguida, fixadas e coradas utilizando corante panótico. As lâminas foram codificadas e analisadas. Um mil células binucleadas (BN) por indivíduo foram avaliadas quanto à presença de MN e NPB.

Para a dosagem sérica das citocinas IL-6 e TNF- $\alpha$ , as amostras de soro foram separadas por centrifugação durante 10 min a 750 rpm e congeladas a  $-80^\circ\text{C}$  para análise posterior. As citocinas IL-6 e TNF- $\alpha$  foram determinadas por kits de ELISA. As amostras foram analisadas em triplicata.

O DNA genômico foi isolado a partir de sangue total pelo método de *salting-out*, de acordo com Lahiri e Nurnberger (1991). O polimorfismo *OGG1* foi genotipado de acordo

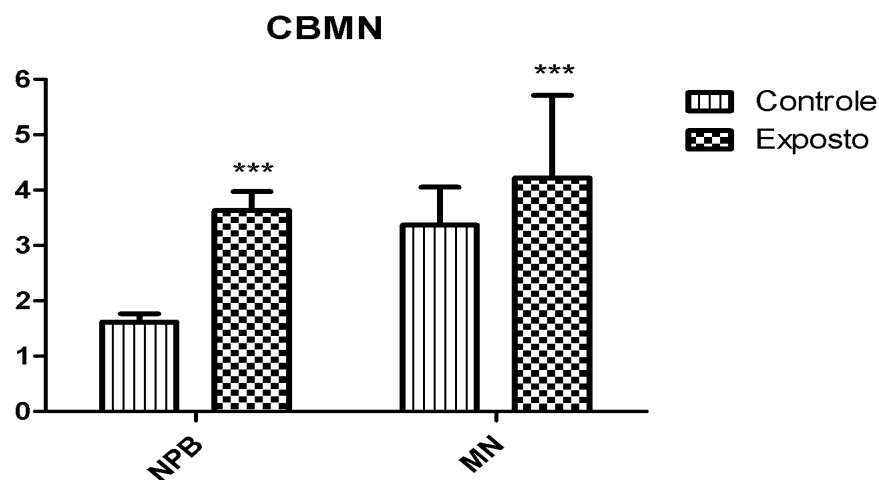
com De Ruyck et al. (2005). Uma alíquota do produto de PCR foi clivada com Fnu4HI. O polimorfismo *XRCC1* foi genotipado utilizando os iniciadores e condições de PCR indicados por Lunn et al. (1999). Os alelos foram detectados após clivagem com enzima PvuII. Os genótipos foram identificados utilizando um gel de poliacrilamida e corados com nitrato de prata.

Para a análise estatística, foram feitas comparações entre os grupos controle e exposto pelo teste de Mann-Whitney, quando não houve distribuição normal dos dados. Por outro lado, quando houve distribuição normal de dados, as diferenças foram testadas pelo teste-t Student. As correlações foram analisadas através do teste Spearman. O nível crítico para a rejeição da hipótese nula foi considerado como sendo um valor P de < 0,05. A análise estatística foi realizada com o software Graphpad PRISM, versão 6.0.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

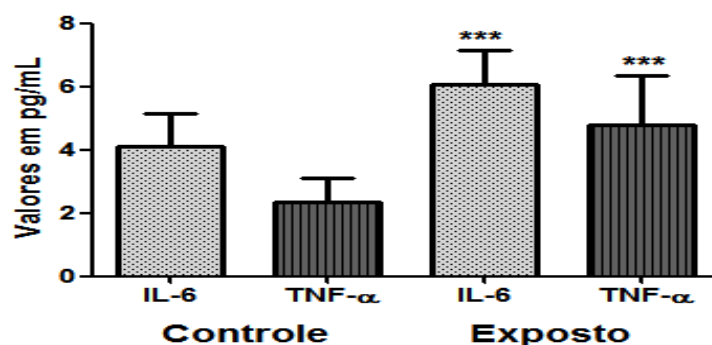
Indivíduos do grupo exposto a agentes exógenos mostraram um aumento significativo nas frequências de danos ao DNA, indicados pela presença de NPB e MN, em comparação com o grupo controle (Figura 1). A formação de NPB é um biomarcador de cromossomos dicêntricos ou oriundos de falha de reparo de DNA, ambos decorrentes de quebras de cadeia única, enquanto MN surgem de fragmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros perdidos na anáfase durante a divisão nuclear (FENECH et al., 2016).

**Figura 1:** Dados dos parâmetros CBMN (MN e NPB) para grupos controle e exposto (média ± DP). \*\*\*P < 0,001 (teste Mann-Whitney).



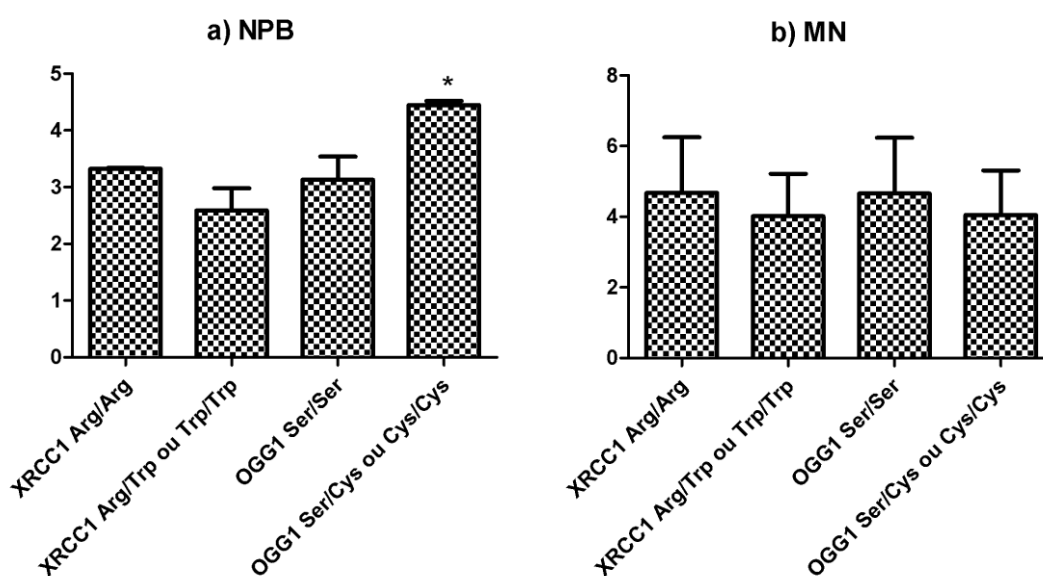
Quando foram comparados os níveis séricos de IL-6 e TNF- $\alpha$  entre os grupos estudados, ambos os marcadores inflamatórios apresentaram-se significativamente maiores nos fumicultores em comparação aos não expostos (Figura 2). As classes químicas dos organofosforados e clorpirifos podem promover a produção de IL-6 e TNF- $\alpha$ , de forma que os indivíduos expostos estejam apresentando maior susceptibilidade à toxicidade de agrotóxicos, podendo acarretar na incidência de doenças inflamatórias crônicas (GANGEMI et al., 2016).

**Figura 2:** Marcadores inflamatórios (IL-6 e TNF- $\alpha$ ) em grupos controle e exposto, apresentados em pg/mL (média ± DP). \*\*\*P < 0,001 em relação ao grupo controle (Teste t-Student).



Em relação à influência dos polimorfismos, no grupo dos fumicultores foi observado aumento significativo de NPB influenciado pelo alelo *OGG1 Cys/-* (Figura 3 a), quando comparados com fumicultores com genótipo *OGG1 Ser/Ser*. Estudos fornecem evidências de que o efeito combinado de diferentes genes de reparo de DNA e sua interação com agentes genotóxicos ambientais pode modular a indução de danos. Kershaw e Hodges (2012) demonstraram influência do mesmo alelo do nosso estudo quanto a falhas no reparo de dano oxidativo.

**Figura 3:** Efeitos dos genótipos *XRCC1 Arg194Trp* e *OGG1 Ser326Cys* sobre os parâmetros NPB (a) e MN (b) no grupo exposto (média ± DP). \*  $P < 0,05$  em relação ao *OGG1 Ser/Ser* (Teste t-Student).



## CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesse estudo demonstram evidências de danos genotóxicos devido à exposição ocupacional ao longo prazo por agroquímicos, associados a marcadores do sistema imune em agricultores de lavouras de fumo. Portanto, torna-se cada vez mais evidente que essas populações precisam ser biomonitoradas e que o uso de EPI na sua forma completa é imprescindível.

## REFERÊNCIAS

- DA SILVA, F. R.; DA SILVA, J.; NUNES, E.; BENEDETTI, D.; KAHL, V.; ROHR, P.; ABREU, M. B.; THIESEN, F. V.; KVITKO, K., Application of the Buccal Micronucleus Cytome Assay and Analysis of PON1Gln192Arg and CYP2A6\*9 (248T>G) Polymorphisms in Tobacco Farmers, **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 53, p. 525-534, 2012.
- DA SILVA, F. R.; KVITKO, K.; ROHR, P.; ABREU, M. B.; THIESEN, F. V.; DA SILVA, J., Genotoxic assessment in tobacco farmers at different crop times, **Sci. Total Environ.**, v. 490, p. 334-341, 2014.
- BENEDETTI, D.; NUNES, E.; SARMENTO, M.; PORTO, C.; DOS SANTOS, C. E. I.; DIAS, J. F.; DA SILVA, J., Genetic damage in soybean workers exposed to pesticides: Evaluation with the comet and buccal micronucleus cytome assays, **Mutation Research**, v. 752, p. 28-33, 2013.
- CORSINI, E.; LIESIVUORI, J.; VERGIEVA, T.; VAN LOVEREN, H.; COLOSIO, C., Effects of pesticide exposure on the human immune system, **Hum. Exper. Toxicol.**, v. 27, p. 671-680, 2008.
- DHOUIB, I.; JALLOULI, M.; ANNABI, A.; MARZOUKI, S.; GHARBI, N.; ELFAZAA, S.; LASRAM, M. M.; From immunotoxicity to carcinogenicity: the effects of carbamate pesticides on the immune system, **Environ. Sci. Pollut. Res. Int.**, v. 23, p. 9448-9458, 2016.
- LAHIRI, D. K.; NURNBERGER JR, J. I., A rapid non-enzymatic method for preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies, **Nucleic Acid Res.**, v. 19, p. 5444, 1991.
- DE RUYCK, K.; VAN EIJKEREN, M.; CLAES, K.; MORTHER, R.; DE PAEPE, A.; VRAL, A.; DE RIDDER, L.; THIERENS, H., Radiation-induced damage to normal tissues after radio-therapy in patients treated for gynecologic tumors: association with single nucleotide polymorphisms in XRCC1, XRCC3, and OGG1 genes and in vitro chromosomal radiosensitivity in lymphocytes, **Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.**, v. 62, p. 1140-1149, 2005.
- LUNN, R. M.; LANGLOIS, R. G.; HSIEH, L. L.; THOMPSON, C. L.; BELL, D. A., XRCC1 polymorphisms: effects on aflatoxin B1-DNA adducts and glycophorin A variant frequency, **Cancer Res.**, v. 59, p. 2557-2561, 1999.
- FENECH, M.; NERSESYAN, A.; KNASMUELLER, S., A systematic review of the association between occupational exposure to formaldehyde and effects on chromosomal DNA damage measured using the cytokinesis-block micronucleus assay in lymphocytes, **Mutat. Res.**, v. 770, p. 46-57, 2016.
- GANGEMI, S. et al., Occupational and environmental exposure to pesticides and cytokine pathways in chronic diseases (review), **Int. J. Mol. Med.**, v. 38, p. 1012-1020, 2016.
- KERSHAW, R. M.; HODGES, N. J., Repair of oxidative DNA damage is delayed in the Ser326Cys polymorphic variant of the base excision repair protein OGG1, **Mutagenesis**, v. 27, p. 501-510, 2012.