



AVALIAÇÃO DE DANO AO DNA OCASIONADO POR EXPOSIÇÃO A AGROQUÍMICOS EM SOJICULTORES

Bárbara Lopes Alderete¹

Danieli Benedetti²

Juliana da Silva³

Resumo

A cultura da soja está amplamente difundida no estado do Rio Grande do Sul (RS). Os agroquímicos são usados para prevenir ou controlar doenças de plantas, pestes ou plantas invasoras. A utilização de agroquímicos de forma misturada, freqüente e em baixas doses representa riscos para os agricultores, e para toda a sociedade. Os biomarcadores de exposição podem ser usados para confirmar e avaliar a exposição individual ou de um grupo, para uma substância em particular, estabelecendo uma ligação entre a exposição externa e a quantificação da exposição interna. Dentre os biomarcadores, o Ensaio Cometa (EC) é uma técnica rápida e sensível na quantificação de lesões e detecção de efeitos de reparo no DNA em células individuais de eucariotos. O presente estudo tem por objetivo avaliar efeitos genotóxicos pelo Ensaio Cometa modificado com enzimas em trabalhadores rurais produtores de soja expostos à agroquímicos. A população utilizada no estudo é de sojicultores do município de Espumoso. A amostragem é de sangue periférico, de indivíduos expostos a agroquímicos, além do grupo controle (não expostos). Este estudo, envolveu um total de 100 indivíduos (homens e mulheres). Deste total, 50 indivíduos foram selecionados a partir da exposição aos agroquímicos e os demais são controles, cuja ocupação profissional esteja ausente de substâncias genotóxicas. Das amostras foram confeccionadas lâminas, para a avaliação por microscopia óptica para identificar a migração de segmentos e o grau de dano desse DNA. Para análise dos resultados foi utilizado ANOVA e o teste *t-Student*, usando o pacote estatístico Prisma 5.

Palavras-chave: agrotóxicos, soja, agricultores, biomarcadores e ensaio cometa

INTRODUÇÃO

A soja começou a ser cultivada na Ásia, e se expandiu a partir de cruzamentos naturais entre espécies de soja selvagem que ao longo dos anos foram domesticadas e melhoradas por cientistas da antiga China (EMBRAPA, 2014). Os investimentos em pesquisa levaram à "tropicalização" da soja, permitindo, pela primeira vez, que o grão fosse plantado com sucesso, em regiões de baixas latitudes (EMBRAPA, 2014). O Brasil é o segundo maior produtor e exportador de soja do mundo. Cinco estados são responsáveis por 80% da produção de soja do Brasil; um deles é o estado do Rio Grande do Sul. O aumento significativo na produção de soja implica a utilização de vários agroquímicos para a proteção das culturas e controle de pragas. Trabalhadores rurais são expostos simultaneamente a uma mistura complexa de agroquímicos, tais como os organofosforados, piretroides e organoclorados, bem como fungicidas e herbicidas utilizados na preparação de misturas e aplicação por pulverizações destes produtos químicos nas lavouras (Angerer *et al.*, 2007). A

1 Aluna do curso de Ciências Biológicas – Bolsista PROBIC/FAPERGS – ba_lopes@yahoo.com.br

2 Aluna doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde – danieli.benedetti@yahoo.com.br

3 Professor do curso de Ciências Biológicas e PPGBioSaúde – juliana.silva@ulbra.br

análise do risco de contaminação de populações expostas envolve o conhecimento das fontes de emissão, contaminantes, biotransformação e acúmulo no ambiente, assim como vias de absorção no organismo, doses potenciais e internas absorvidas, biodisponibilidade de dose biologicamente efetiva e de possíveis efeitos prejudiciais a saúde dos organismos (Castro, V. *et al.*, 1999). Por esse motivo, intoxicações por agroquímicos utilizados na agricultura representam um problema de saúde pública mundial (Smith *et al.*, 2006). As publicações mais recentes da Organização Internacional do Trabalho/ Organização Mundial da Saúde (OIT/OMS) estimam que, entre trabalhadores de países em desenvolvimento, os agroquímicos causam anualmente 70 mil intoxicações agudas e crônicas que evoluem para óbito. E pelo menos 7 milhões de doenças agudas e crônicas não-fatais, devido aos agroquímicos (Food and Agriculture Organization of the United Nations–FAO e World Health Organization–WHO, 2005). O genoma não é muito estável, sofre alterações durante sua própria síntese ou é alvo da ação de vários agentes físico-químicos provenientes do ambiente externo ou internos, decorrentes do próprio metabolismo celular. Portanto, as células possuem uma série de mecanismos que reparam essas lesões, e na ausência desse mecanismo de reparo, as lesões podem afetar o processo de replicação e transcrição, podendo levar à morte celular ou, então fixar-se alterando a sequência do DNA original, ou seja, resultando em mutações. Mutações são mudanças permanentes que ocorrem nos genes. As mutações induzidas são produzidas por diferentes agentes físico-químicos, denominados mutagênicos, assim como os agroquímicos. Agroquímicos podem provocar mutações através de lesões no DNA. É importante observar que uma lesão, por si só, não se constitui em uma mutação. A lesão só induzirá uma mutação se, após um ciclo replicativo, ela não for reparada. Outro ponto que deve ser ressaltado é que nem toda lesão é mutagênica (Matioli e Fernandes, 2012). Devido a evidências de efeitos carcinogênicos causados por agroquímicos e o crescente risco de desenvolvimento de malignidades em populações expostas ocupacionalmente, tem sido necessário estudos envolvendo trabalhadores expostos (Singh *et al.* 2010). O biomonitoramento ocupacional examina a exposição de trabalhadores a uma variedade de agentes químicos, biológicos ou fisiológicos para determinar se a exposição resulta em um maior risco de efeitos adversos à saúde (Valverde e Rojas 2009). Devido a evidências de efeitos carcinogênicos causados por agroquímicos e o crescente risco de desenvolvimento de malignidades em populações expostas ocupacionalmente, tem sido necessário estudos envolvendo trabalhadores expostos (Singh *et al.*, 2010). Os biomarcadores de exposição podem ser usados para confirmar e avaliar a exposição individual ou de um grupo, para uma substância em particular, estabelecendo uma ligação entre a exposição externa e a quantificação da exposição interna (Amorin, 2003). O Ensaio Cometa (EC) é uma técnica rápida e sensível na quantificação de lesões e detecção de efeitos de reparo no DNA em células individuais de eucariotos. O EC é um teste de genotoxicidade capaz de detectar danos no DNA induzidos por agentes alquilantes, intercalantes e oxidantes. Este pode ser realizado tanto em animais como em plantas, demonstrando grande sensibilidade e rapidez de resultados em estudos de genotoxicidade (Da Silva *et al.*, 2000). O ensaio cometa, deriva do termo "cometa", sendo designado por diferentes padrões de migração produzidos pelo DNA de células submetidas à eletroforese. Foi popularizado na década de 1990 e mesmo após 20 anos de uso, contribui na atualidade sobre ensaios que medem a atividade genotóxica de algumas substâncias (Moller, 2006; Angerer *et al.*, 2007; Collins *et al.*, 2008). O método permite verificar diferenças intercelulares sobre danos e reparos no DNA com alta sensibilidade (1 a 10000 células) (Moller, 2006; Collins, *et al.*, 2008; Da Silva *et al.*, 2008; Valverde e Rojas, 2009). O princípio do teste leva em conta o comportamento do DNA em células individualizadas e a sua organização no núcleo. A versão alcalina é realizada em eletroforese com pH maior que 13,0, pois permite que o DNA desnature ainda mais após a lise, proporcionando detectar danos diretos que podem ser facilmente reparados após a

exposição ao agente genotóxico, e também a detecção dos danos indiretos, gerados a partir da formação de locais álcali-lábeis, reparados por EndoIII, hOOG1 e FPG. Os nucleóides incubados com estas enzimas de reparo possibilitam a observação aumentada sobre os índices de dano no DNA em até quatro vezes, destacando a presença de oxidação das bases nitrogenadas (Collins *et al.*, 1996; Smith *et al.*, 2006). Embora a pesquisa brasileira sobre o impacto do uso de agroquímicos sobre a saúde humana também tenha crescido nos últimos anos, ainda é insuficiente para conhecer a extensão da carga química de exposição ocupacional e a dimensão dos danos à saúde, decorrentes do uso intensivo de agroquímicos. Um dos problemas apontados é a falta de informações sobre o consumo de agroquímicos e a insuficiência dos dados sobre intoxicações por estes produtos. A relevância do tema é destacada ao se considerar a dimensão e a diversidade dos grupos expostos: os trabalhadores da agropecuária, saúde pública, empresas desinsetizadoras, indústrias de agroquímicos e do transporte e comércio de produtos agropecuários (Faria *et al.*, 2007). O objetivo do presente estudo foi avaliar efeitos genotóxicos pelo Ensaio Cometa modificado com enzimas em trabalhadores rurais produtores de soja expostos à agroquímicos.

METODOLOGIA

Este estudo, envolveu um total de 100 indivíduos (homens e mulheres), residentes em Espumoso, região norte do Estado do RS, Brasil. Deste total, 50 indivíduos foram selecionados a partir da exposição aos agrotóxicos e os demais serão controles, cuja ocupação profissional esteja ausente de substâncias genotóxicas. Foram incluídos na amostra do grupo exposto: homens e mulheres adultos que estão expostos ocupacionalmente aos agrotóxicos durante o plantio da soja e sua exposição, que não tomam medicamento sabidamente genotóxico, que não tenham histórico de câncer; indivíduos não fumantes, que não consumam bebidas alcoólicas. O grupo controle foi formado por indivíduos adultos da mesma região dos sojicultores, com os mesmos critérios de inclusão e exclusão adotados ao grupo exposto, exceto ao fator de exposição. As coletas de sangue foram realizadas por punção intravenosa a vácuo, com agulhas, tubos e suportes estéreis descartáveis. De cada indivíduo foi coletado um total de 15 mL de sangue venoso em um tubo com anticoagulante (Heparina) e protegido da luz. Para este estudo foi utilizada a versão alcalina do ensaio cometa modificado com enzimas, realizada conforme descrito por Singh *et al.* (1988), modificado por Da Silva *et al.* (2000) e adaptado para o Laboratório de Genética Toxicológica da Ulbra. As lâminas foram recobertas com agarose e as células sanguíneas (5 µL) embebidas em 95 µL de agarose com baixo ponto de fusão. Após a solidificação da mistura as lâminas foram mantidas em tampão de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 10,0-10,5) contendo 1% (v/v) de Triton X-100 e 10% (v/v) de dimetilsulfóxido (DMSO) para transporte e posterior análise, por no mínimo 1h e no máximo sete dias, protegidas da luz. Foram reservadas cubetas para incubação com as enzimas EndoIII, FPG e hOOG1, onde após a lise, as lâminas foram lavadas três vezes em solução tampão, que compreende: 400 mM Hepes (5,2g), 1M KCl (3,73g), 5 mM EDTA (0,093g), 2mg/mL BSA (0,1g), e adição de 60 µl da solução da enzima EndoIII, hOOG1 e FPG, ambas condicionadas a 37°C em câmara úmida. As enzimas testadas foram Formamidopirimidina DNA glicosilase (FPG), capaz de reconhecer bases púricas, principalmente 7,8-dihidro-8-oxo-deoxiguanosina (8-OHgua), a Endonuclease III (ENDO III), detecta pirimidinas oxidadas e a 8-hidroxiguanina DNA glicosilase (hOOG1), reconhece produtos 8-oxo-7,8-dihidroguanina (8oxo-G). Após o procedimento as lâminas foram colocadas em cubeta de eletroforese horizontal, sendo cobertas por solução tampão alcalina (300 mM NaOH e 1 mM EDTA, pH>13) recém-preparada, onde permaneceram por 20 minutos. Neste período, o DNA é submetido à eletroforese por 20 minutos a 25 volts (0,90 V/cm) e 300 mA. Posteriormente, as lâminas foram neutralizadas com solução tampão 0,4 M Tris (pH 7,5) e coradas com nitrato de prata. A análise microscópica permitiu identificar a

migração de segmentos desse DNA e as células foram consideradas normais, ou seja sem danos, sempre que a estrutura nuclear oval estiver conservada; já as células que sofreram algum tipo de lesão foram classificadas conforme o tamanho da cauda, uma vez que equivale ao grau de dano ao DNA (Tice *et al.*, 2000; Moller, 2006; Collins *et al.*, 2008; Holland *et al.*, 2008).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos até o momento mostraram que o grupo de expostos obteve maior valor de índice de dano e frequência de dano, com $40,7 \pm 22,6$ e $26,4 \pm 11,9$ respectivamente, quando comparado ao grupo de não expostos ($35,3 \pm 22,5$ e $23,4 \pm 13,3$). Quando comparamos o uso de enzimas no ensaio cometa com o ensaio cometa convencional, a enzima hOGG1 apresentou maior valor de índice de dano ($108,8 \pm 85,9$), quanto de frequência de dano ($46,1 \pm 23,9$) nos dois grupos analisados, como podemos ver na tabela 1.

Tabela 1. Média e desvio padrão obtida pelo Ensaio Cometa modificado com enzimas

Grupos	Não expostos (n=38)	Expostos (n=44)
Índice de dano (0-400)		
Convencional	$35,3 \pm 22,5$	$40,7 \pm 22,6$
FPG	$50,1 \pm 32,6$	$56,6 \pm 45,1$
ENDO III	$56,5 \pm 37,0$	$49,9 \pm 41,9$
hOGG1	$64,2 \pm 58,0$	$108,8 \pm 85,9^*$
Frequência de Dano (%)		
Convencional	$23,4 \pm 13,3$	$26,4 \pm 11,9$
FPG	$33,8 \pm 14,6$	$35,4 \pm 18,2$
ENDO III	$36,3 \pm 17,1$	$27,8 \pm 20,8$
hOGG1	$34,3 \pm 20,62$	$46,1 \pm 23,9^*$

* $P < 0.05$: Significante em relação aos grupos não expostos e expostos (teste *t*-Student)

Estes resultados demonstram que embora para este grupo de sojicultores expostos o ensaio cometa convencional não demonstra aumento significativo, o ensaio cometa modificado utilizando a enzima hOGG1, que reconhece 8oxo-G, demonstrou aumento significativo em relação ao ensaio cometa convencional e em relação ao grupo não exposto.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando que os sojicultores estão constantemente expostos às misturas de agroquímicos potencialmente genotóxicas, é importante realizar uma avaliação do risco ocupacional entre estes indivíduos, especialmente porque o biomonitoramento permite encontrar medidas de controle e prevenção de doenças. Além disto, o Ensaio Cometa é uma técnica rápida e sensível na quantificação de lesões e detecção de efeitos de reparo no DNA, muito utilizado por sua versatilidade e abrangência das suas possíveis aplicações. E com o uso de enzimas, o Ensaio Cometa torna-se mais sensível e específico.

REFERÊNCIAS

- AMORIN, L.C.A. Os Biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. **Rev Brasil Epidemiol.**, v. 6, p. 158-170, 2003.
- ANGERER, J.; EWERSB, U.; WILHELM, M. Review: Human biomonitoring: of the art. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 210, p. 201-228, 2007.
- CASTRO, V.; SILVEIRA, M.; PEREZ, M. Application of clinical indicators of exposition in the evaluation of family agriculture health: the Sumaré case – Brazil. **International Journal of Sustainable and Development World Ecology**, Lancaster, v. 6, p. 172-184, 1999.
- COLLINS, A.R. et al. Review: The comet assay: topical issues. **Mutagenesis**, v. 23, p. 143-151, 2008.
- COLLINS, A.R.; DUSINSKA, C.M. et al. Oxidative Damage to DNA: Do we have a reliable biomarker? **Environmental Health Perspectives**, v. 104, p. 465-469, 1996.
- DA SILVA, J. et al. An Alkaline single-cell gel electrophoresis (comet) assay for environmental biomonitoring with native rodents. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, p. 241-245, 2000.
- DA SILVA, J. et al. Evaluation of genetic damage in a Brazilian population occupationally exposed to pesticides and its correlation with polymorphisms in metabolizing genes. **Mutagenesis**, v. 23, p. 415-422, 2008.
- EMBRAPA, EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA E AGROPECUÁRIA EMBRAPA soja. <http://www.cnpso.embrapa.br/producaosoja/index.htm>. Disponível em: 21/03/2015.
- HOLLAND, N. et al. Review The micronucleus in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: The HUMN project perspective on current status and Knowledge gaps. **Mutation Research**, v. 659, p. 93-108, 2008.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO) and WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Manual on development and use of FAO and WHO specifications for pesticides. In: Joint meeting on pesticide specifications (JMPS). Second revision, p. 1-310, 2010.
- MATIOLI, S.R.; FERNANDES, F.M.C. **Biologia Molecular e Evolução**. 2 nd ed., Ribeirão Preto: Holos Editora, p. 250, 2012.
- MOLLER, P. Assessment of reference values for DNA damage detected by the comet assay in human blood cell DNA. **Mutation Research**, v. 612, p. 84-104, 2006.
- SINGH, N.P. et al. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental cell Research**, v. 175, p. 184-191, 1988.
- SINGH, S. et al. DNA damage and cholinesterase activity in occupational workers exposed to pesticides. **Environ Toxicol Pharmacol** v. 31, p. 278-285, 2010.
- SMITH, C.C.; O'DONOVAN, M.R.; MARTIN, E.A. hOGG1 recognizes oxidative damage using the comet assay with greater specificity than FPG or ENDOIII. **Mutagenesis**, v. 21, p. 185-190, 2006.
- VALVERDE, M.; ROJAS, E. Review: Environmental and occupational biomonitoring using the Comet assay. **Mutation Research**, v. 681, p. 93-109, 2009.
- FARIA, N.M.X.; FASSA, A.G.; FACCHINI, L.A. Intoxicação por agrotóxicos no Brasil: Os sistemas oficiais de informação e desafios para realização de estudos epidemiológicos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 12, p. 25-38, 2007.