



A EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL A AGROQUÍMICOS: MUTAGENICIDADE EM FUMICULTORES

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 e surtimento. Foi utilizado o teste de micronúcleo em Mucosa Oral em agricultores de Santa Cruz do Sul - RS. Um total de 212 indivíduos foram avaliados: 144 expostos, sendo 112 durante o período de colheita, e 32 durante o surtimento; e 68 controles (indivíduos que residem na mesma região, mas que não possuem contato com o plantio). 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, podemos concluir que a prática de colheita e surtimento das folhas de tabaco provoca um aumento da instabilidade genética (danos ao DNA), e morte celular, através de danos oxidativos. 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 haver um biomonitoramento de risco ocupacional, a fim de avaliar a toxicidade genética em trabalhadores rurais, expostos a pesticidas, bem como a necessidade da utilização de equipamentos de proteção adequados.
Palavras-chave: Pesticidas; micronúcleo; genotoxicidade; biomonitoramento

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., 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

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

² Doutor em Biologia Celular e Molecular aplicada à saúde.

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

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 dezembro de 2011 e fevereiro de 2014 foram coletadas amostras bucais de 144 trabalhadores rurais em uma plantação de tabaco (coletadas durante os períodos de colheita e surtimento), e 68 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 and 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, foram realizadas lavagens, utilizando solução tampão de mucosa, e posteriormente, fixado em Carnoy. Foi feita a suspensão celular sobre a lâmina, e deixado secar ao ar. As lâminas foram coradas com Feugen e Fast Green, lavadas com água destilada, e secas ao ar. Para cada indivíduo, a frequência de MN, binucleadas, e brotos nucleares, bem como anomalias genéticas (cromatina condensada, cariorréticas, cariolíticas, e picnóticas), foram avaliadas em 2000 células/indivíduo (THOMAS et al., 2009).

RESULTADOS

As atividades de colheita foram realizadas pelos indivíduos principalmente em campos abertos, enquanto que as atividades de surtimento foram realizadas em galpões. Não foram detectadas diferenças significativas na média de idade entre os grupos. O tempo de exposição média para o grupo exposto foi de 27 anos (tempo de permanência na produção de tabaco). Poucos trabalhadores relataram o uso de equipamento de proteção individual durante a época da colheita, e na maioria das vezes o principal equipamento utilizado foi luvas. Durante o

surtimento, trabalhadores rurais não relataram uso de equipamento de proteção individual. O tempo de exposição é de 8 h às 10h por dia durante os períodos de colheita e de surtimento.

Foram observados aumento de micronúcleos e células binucleadas apenas para o grupo de surtimento, que foram significativamente maiores do que o grupo controle e de colheita (Tabela 1). Em relação à morte celular (Tabela 2), observou-se um aumento significativo apenas para as células picnóticas, quando comparado o grupo exposto com o não exposto. Não foi observado efeito de idade e tempo de exposição.

Tabela 1. Dano DNA: Resultados do Ensaio de Micronúcleos de Mucosa Oral de células coletadas dos grupos controle e exposto. Dados apresentados como média \pm desvio padrão de 2000 células por indivíduo.

Dano ao DNA	Controle	Colheita	Surtimento
Micronúcleos			
Homens	2.96 \pm 2.58	1.98 \pm 2.35	7.57 \pm 3.35 ^{b,d}
Mulheres	1.19 \pm 1.25	2.07 \pm 3.07	7.31 \pm 4.97 ^{b,d}
Total	2.20 \pm 2.28	2.02 \pm 2.69	7.40 \pm 4.38 ^{b,d}
Broto Nuclear			
Homens	2.14 \pm 1.43	2.07 \pm 2.43	3.86 \pm 2.12
Mulheres	1.71 \pm 1.05	2.37 \pm 3.10	3.30 \pm 2.98
Total	1.96 \pm 1.29	2.21 \pm 2.76	3.50 \pm 2.66
Células Binucleada			
Homens	3.60 \pm 2.47	4.98 \pm 2.67	10.29 \pm 4.99 ^{a,c}
Mulheres	4.52 \pm 2.80	4.85 \pm 2.58	8.84 \pm 5.71 ^{a,c}
Total	4.00 \pm 2.60	4.91 \pm 2.62	9.35 \pm 5.38 ^{a,c}

^a Significativo P<0,05, ^b P<0,001 em relação ao grupo controle; ^c Significativo P<0,01, ^d P<0,001 em relação ao grupo exposto (colheita); ANOVA, Tukey's Multiple Comparison Test.

Tabela 2. Morte celular: Resultados do Ensaio de Micronúcleos de Mucosa Oral de células coletadas dos grupos controle e exposto. Dados apresentados como media \pm desvio padrão de 2000 células por indivíduo

Tipos celulares	Controle	Colheita	Surtimento
Cromatina condensada			
Homens	104.7 \pm 46.11	110.2 \pm 58.50	61.43 \pm 57.52 ^{a,c}
Mulheres	112.4 \pm 36.56	96.18 \pm 57.39	66.69 \pm 61.46 ^{a,c}
Total	108.9 \pm 42.04	103.7 \pm 58.07	64.85 \pm 58.63 ^{a,c}
Células cariorréticas			
Homens	99.00 \pm 45.66	93.46 \pm 88.44	44.43 \pm 26.53 ^{b,d}
Mulheres	81.33 \pm 32.80	78.30 \pm 66.69	51.85 \pm 39.41 ^{b,d}
Total	91.43 \pm 41.22	86.41 \pm 78.99	49.25 \pm 34.87 ^{b,d}
Células picnóticas			
Homens	4.64 \pm 2.88	10.63 \pm 8.54 ^b	8.00 \pm 3.78 ^b
Mulheres	3.90 \pm 2.12	10.95 \pm 10.37 ^b	9.00 \pm 5.64 ^b

Total	4.33 ± 2.58	10.78 ± 9.37 ^b	8.65 ± 4.98 ^b
Células cariolíticas			
Homens	39.00 ± 23.63	16.93 ± 11.08 ^b	12.29 ± 6.77 ^b
Mulheres	25.10 ± 18.42	13.15 ± 9.96 ^b	12.31 ± 7.07 ^b
Total	31.51 ± 21.86	15.17 ± 10.69 ^b	12.30 ± 6.79 ^b

^a Significativo P < 0,05; ^b P < 0,001 em relação ao grupo controle; Significativo ^c P < 0,05; ^d P < 0,001 em relação ao grupo exposto (colheita). ANOVA; Turkey's Multiple Comparison Test.

CONCLUSÃO

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). O aumento de células com micronúcleo foi significativo quando comparado o grupo exposto (surtimento), com o grupo controle. Processos mutagênicos, observados na formação de MN, indicam a persistência de lesões ou ocorrência de reparos incorretos (HOLLAND et al., 2008). Um aumento de células binucleadas foi também demonstrada para o grupo de surtimento, que representa os danos causados pela exposição a agentes que tinham um efeito sobre a citocinese (TOMAS et al., 2009). Foi observado um aumento de células picnóticas para ambos os grupos de agricultores de tabaco. Este tipo de morte celular está associada a citotoxicidade, que também é evidente numa fase tardia de apoptose; processo sob o controle genético.

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 doenças degenerativas.

REFERÊNCIAS

- BOLOGNESI, C. Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies, **Mutation Research**, 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 Research**, 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 Research**, 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 Research**, 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 Research**, 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 (1-2), 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.