



## AVALIAÇÃO DA INSTABILIDADE GENÔMICA EM FUMICULTORES

Henrico da Rosa Vieira<sup>1</sup>  
Vivian Kahl<sup>2</sup>  
Juliana da Silva<sup>3</sup>

### Resumo

Agroquímicos são amplamente utilizados nas mais diversas práticas agrícolas e o uso deles por trabalhadores de diversas lavouras têm demonstrado grande impacto na saúde humana. Estudos indicam aumento de instabilidade genômica em indivíduos ocupacionalmente expostos a agroquímicos. O objetivo deste estudo foi analisar a exposição crônica a agroquímicos em produtores de tabaco gaúchos em relação ao comprimento de telômeros (TL) em linfócitos isolados, brotos nucleares (BUD), micronúcleos (MN) e células *broken-egg* da mucosa oral e explorar a relação entre esses parâmetros. Foram amostrados 65 indivíduos: 28 agricultores expostos e 37 indivíduos controle da mesma região. TL foi quantificado por qPCR. A presença de MN, BUD e *broken-egg* foi verificada a partir da análise das lâminas de mucosa oral sob microscopia óptica. Os resultados mostram que TL do grupo exposto mostrou-se reduzido, enquanto a incidência de células com BUD, *broken-egg* e MN apresentaram-se aumentadas, em relação ao grupo controle. O estudo comprova a existência de danos genéticos com aumento de MN, BUD e *broken-egg* em indivíduos expostos, provavelmente associado a redução de TL.

Palavras chave: mucosa oral, telômero, fumicultura.

### INTRODUÇÃO

Diariamente o ser humano encontra-se exposto a diversos agentes químicos, capazes de prejudicar sua saúde, levando ao desenvolvimento de diversas doenças. Dentre estes agentes podemos citar agroquímicos que apresentam uma resistência inerente ao processo de degradação natural. Agroquímicos são amplamente utilizados nas mais diversas práticas agrícolas, compondo um potente efeito tóxico a seres humanos, em especial, aos

---

1 Aluno do curso de graduação em Farmácia Henrico da Rosa Vieira – Bolsista FAPERGS – [henrico.rosavieira@gmail.com](mailto:henrico.rosavieira@gmail.com)

2 Doutoranda em Biologia Celular e molecular aplicada à Saúde Biomédica – Bolsista CAPES – [vivian.kahl@gmail.com](mailto:vivian.kahl@gmail.com)

3 Professora do curso de graduação de Biologia da ULBRA e PPGBiosaude – [juliana.silva@ulbra.br](mailto:juliana.silva@ulbra.br)

trabalhadores de lavouras que estão expostos ocupacionalmente a esses compostos (BOLOGNESI; HOLLAND, 2016). Entre as lavouras destacam-se no Estado do Rio Grande do Sul a fumicultura, que além dos agroquímicos sintéticos e fertilizantes, estão expostos a uma grande quantidade de nicotina, presente nas folhas do tabaco. O emprego de agroquímicos por trabalhadores de inúmeras lavouras têm demonstrado diversos impactos na saúde humana, sendo vinculado a problemas no aparelho reprodutivo (BOLOGNESI; HOLLAND, 2016), problemas de desenvolvimento (RAUH et al., 2012), distúrbios degenerativos (CANNON; GREENAMYRE, 2011), risco carcinogênico (BOLOGNESI et al., 2011), depressão e suicídio (FREIRE; KOIFMAN, 2013).

O emprego do teste de Micronúcleos de Mucosa Oral (*Buccal Micronucleus Cytome* – BMCyt) tem sido cada vez mais utilizado na área clínica, em estudos epidemiológicos e moleculares, para investigar o impacto da nutrição, estilo de vida, exposição a genotoxinas, pesquisa de genótipos e danos no DNA. Este teste é minimamente invasivo, sensível e possibilita estudar danos ao DNA, a instabilidade cromossômica, a ocorrência de morte celular e o potencial regenerativo do tecido da mucosa oral (MO) de humanos. A MO é considerada uma das primeiras barreiras de proteção do organismo e por ser um tecido que proporciona fácil coleta, torna-se um bom indicador de alterações neoplásicas e bastante confiável para monitorar eventos genotóxicos iniciais (THOMAS et al., 2009; VONDRACEK et al., 2001).

A quantificação do telômero humano, a partir do DNA de linfócitos isolados, tem sido empregada em recentes estudos, com a finalidade de avaliar a exposição ocupacional e como um indício de uma possível instabilidade genômica. (KAHL et al., 2016). Existem evidências de que a estabilidade dos telômeros pode ser afetada por exposições ocupacionais e ambientais, enquanto alguns desses fatores têm sido correlacionados com doenças inflamatórias e crônicas (KAHL et al., 2016). Algumas das exposições que estão ligadas ao encurtamento de telômeros incluem os agroquímicos em exposições de longo prazo (KAHL et al., 2016). O encurtamento dos telômeros é um fator de risco para vários tipos de cânceres (HOU et al., 2012).

Este estudo tem como objetivo realizar uma análise da instabilidade cromossômica de indivíduos expostos de forma crônica a agentes químicos potencialmente carcinogênicos, em comparação a um grupo controle não exposto da mesma região

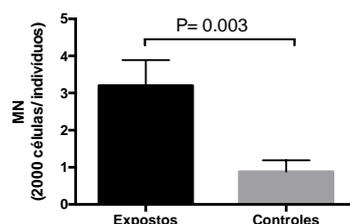
## **METODOLOGIA**

O protocolo a ser adotado para a realização do BMCyt, será o escrito por Thomas *et al.* (2009), com pequenas modificações. A coleta da mucosa oral foi feita a partir de duas escovas *cytobrush*, a qual o material foi raspado em cada uma das bochechas e transferido para um tubo falcon com solução de transporte e sob refrigeração. Em seguida as amostras foram fixadas com etanol e ácido acético e aplicadas em lâminas de microscopia, duas por indivíduo (A e B). Para a coloração do material genético das células, as lâminas foram incubadas com solução de Schiff durante uma hora sob proteção da luz, lavadas em água corrente, seguidas de banho em H<sub>2</sub>O destilada por 1 minuto. O citoplasma foi corado sob imersão em solução Fast Green 0,2% durante 5 segundos. Após a última coloração, as lâminas foram lavadas com H<sub>2</sub>O destilada, e deixadas em temperatura ambiente para a sua total secagem. As lâminas foram codificadas e analisadas sob microscopia em teste cego, os dados foram computados em planilhas. A presença de MN, BUD e *broken-egg* foi verificada a partir da análise das lâminas de mucosa oral sob microscopia óptica.

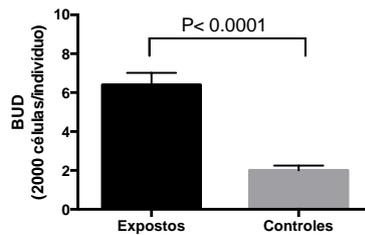
A extração do DNA de linfócitos isolados foi realizada a partir do kit comercial PureLink™ Genomic DNA Kit, seguindo as instruções contidas no manual do fabricante. Toda a quantidade de linfócitos isolados foi ressuspensa em 200 µL de tampão fosfato salino (PBS). O DNA genômico obtido foi quantificado em um Nanodrop MD-1000 e armazenado a -80°C até o uso. A quantificação do tamanho dos telômeros foi feita em reação da cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) (CAWTHON, 2002).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

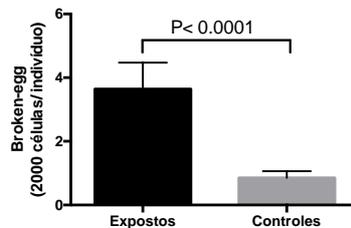
Neste estudo a média de idades dos indivíduos controle foi de  $41,4 \pm 1,7$  e do grupo exposto  $46,3 \pm 2,3$ , que apresentou uma média de anos de trabalho de  $28,7 \pm 2,9$ . As incidências de células com BUD, *broken-* e MN podem ser observadas nas Figuras 1, 2 e 3. Observa-se que todos os parâmetros se encontram aumentados no grupo exposto, em relação ao grupo controle. O tamanho de telômeros do grupo exposto mostrou-se reduzido em comparação ao grupo controle ( $P < 0,0001$ ; Figura 4).



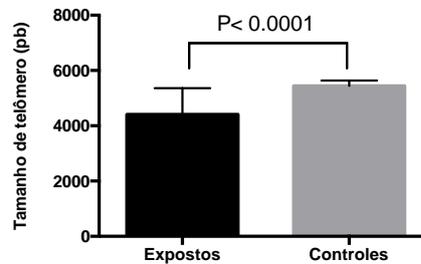
**Figura 1.** Frequência de micronúcleos nos grupos exposto e controle avaliados pelo teste de micronucleus da mucosa oral (Mann-Whitney test).  $P = 0,003$  em relação ao grupo controle.



**Figura 2.** Frequência de BUDs nos grupos exposto e controle avaliados pelo teste de micronucleus da mucosa oral (Mann-Whitney test).  $P < 0,0001$  em relação ao grupo controle.



**Figura 3.** Frequência de *broken-egg* nos grupos exposto e controle avaliados pelo teste de micronucleus da mucosa oral (Mann-Whitney test).  $P < 0,0001$  em relação ao grupo controle.



**Figura 4.** Tamanho de telômeros (pb) nos grupos exposto e controle (Mann-Whitney test).  $P < 0,0001$  em relação ao grupo controle.

Estudos relatam que a ocorrência de dano ao DNA é o primeiro passo para o desenvolvimento carcinogênico e, apesar de danos genéticos não possibilitarem uma estimativa quantitativa de risco de câncer (ANGERER et al., 2007), a exposição crônica a baixas doses de agroquímicos é considerada um importante fator de risco para o desenvolvimento de cânceres (MOSTAFALOU; ABDOLLAHI, 2013).

De acordo com Bolognesi et. al. (2013) células BUD, MN e *broken-egg* são consideradas anomalias genéticas, que podem ser ocasionadas devido à instabilidade genômica, como a redução do tamanho telomérico. Isto devido a incidência de pontes nucleoplasmáticas em linfócitos, que apresentam certa semelhança do mecanismo de formação de danos com mucosa oral.

Estudos também indicam que o encurtamento ou disfunção telomérica natural, que acontece conforme envelhecimento, pode ser acelerado por exposição a fatores ambientais e ocupacionais (ZHANG et al., 2013; KAHL, 2016). Tanto telômeros extremamente curtos quanto longos foram associados com doenças neurodegenerativas e cardiovasculares, risco de

câncer (SANDERS; NEWMAN, 2013), e com alguns polimorfismos (MIRABELLO et al., 2010).

## CONCLUSÕES OU CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi comprovado danos genéticos com aumento de MN, BUD e *broken-egg* em indivíduos expostos, provavelmente associado a redução do tamanho telomérico. A literatura ainda corrobora o encurtamento de telômeros em exposições ocupacionais e ambientais, podendo assim serem considerado bons biomarcadores para a exposição ocupacional.

## REFERÊNCIAS

BOLOGNESI, C., CREUS, A., OSTROSKY-WEGMAN, P., MARCOS, R. Micronuclei and pesticide exposure. **Mutagenesis**, v. 26, p. 19-26, 2011.

BOLOGNESI, C., HOLLAND, N., The use of the lymphocyte cytokinesis-block micronucleus assay for monitoring pesticide-exposed populations. **Mutation Research**, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrrev.2016.04.006>

CANNON, J.R., GREENAMYRE, T. The role of environmental exposures in neurodegeneration and neurodegenerative disease. **Toxicology Science**, v. 124, p. 225-250, 2011.

CAWTHON, R.M. Telomere measurement by quantitative PCR. **Nucleic Acids Res.** 30, v. 47, p. 1-7, 2002.

FREIRE, C., KOIFMAN, S. Pesticides, depression and suicide: A systematic review of the epidemiological evidence. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 216, p. 445-460, 2013.

HOU, L., ZHANG, X., GAWRON, A.J., LIU, J. Surrogate tissue telomere length and cancer risk: shorter or longer? **Cancer Letters**, v. 319, p. 130-135, 2012.

KAHL, V. F. S., SIMON, D., SALVADOR, M., BRANCO, C. S., DIAS, J. F. DA SILVA, F. R., DE SOUZA, C. T., DA SILVA, J. Telomere measurement in individuals occupationally exposed to pesticide mixtures in tobacco fields. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 57, p. 74-84, 2016.

RAUH, V.A., PERERA, F.P., HORTON, M.K., WHYAT T, R.M., BANSAL, R., HAO, X., LIU, J., BARR, D.B., SLOTKIN, T.A., PETERSON, B.S. Brain anomalies in children exposed prenatally to a common organophosphate pesticide. **Proceedings of National Academy of Science USA**, v. 109, p. 7871-7876, 2012

THOMAS, P., HOLLAND, N., BOLOGNESI, C., KIRSCH-VOLDERS, M., BONASSI, S., ZEIGER, E., KNASMUELLER, S., FENECH, M. Buccal micronucleus cytome assay. **Nature Protocols**, v. 4, p. 825-837, 2009.

VONDRACEK, M., XI, Z., LARSSON, P., BAKER, V., MACE, K., PFEIFER, A., et al.  
Cytochrome P450 expression and related metabolism in human buccal mucosa.  
**Carcinogenesis**, v. 22, p.481-8, 2001.