



## INSTABILIDADE GENÔMICA EM FUMICULTORES GAÚCHOS ASSOCIADA A POLIMORFISMOS DE GENES DE METABOLIZAÇÃO E REPARO POR EXCISÃO DE BASE

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

### Resumo

As lavouras de tabaco geram uma enorme renda tributária ao Brasil, no entanto, são prejudiciais à saúde dos agricultores pelo alto uso de agroquímicos sintéticos que demandam, bem como pela exposição à nicotina. Neste contexto, este estudo objetivou correlacionar a presença de Micronúcleos (MN) e células Binucleadas (BN) observados pelo Teste de Micronúcleos de Mucosa Oral (BMCyt) com os polimorfismos de um gene metabolizador (*PON1*) e de dois genes de Reparo por Excisão de Base (BER): *OGG1* e *XRCC1*, tanto num grupo exposto (fumicultores) quanto num grupo não exposto. A exposição foi confirmada pelos maiores níveis de cotinina e elementos inorgânicos (Cl, Zn, P, S) apresentados pelos fumicultores. Quando comparados ao grupo não exposto, os fumicultores apresentaram maiores frequências de MN e BN. Dentro do próprio grupo exposto, *PON1 Gln/Gln* foi associado a aumento de MN, enquanto que as frequências de MN e BN diminuíram significativamente em indivíduos que eram *XRCC1 Arg/Arg*, demonstrando efeito protetor. Nosso estudo evidencia que os genótipos *PON1 Gln/Gln* e *XRCC1 Trp/-* afetam o aumento na frequência de células micronucleadas, o qual tem relação com o aumento de risco no desenvolvimento de câncer.

Palavras chave: exposição ocupacional; suscetibilidade genética; danos ao DNA.

### INTRODUÇÃO

Embora o setor fumageiro seja de grande valia para a economia do Brasil, o mesmo oferece riscos à saúde dos agricultores pela exposição ocupacional aos pesticidas, sendo responsável pela incidência de vários tipos de câncer e distúrbios neurodegenerativos, reprodutivos, de desenvolvimento e metabólicos (KIM;KABIR; JAHAN, 2017).

A cultura do tabaco é demasiadamente longa, durando cerca de 10 meses. Os agricultores fazem uso de agroquímicos sintéticos a fim de fornecer proteção às lavouras, sendo os carbamatos e organofosforados as principais classes químicas utilizadas (DA SILVA et al.,

---

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

<sup>2</sup> Doutora pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde. – Bolsista PROSUP/CAPES – vivian.kahl@gmail.com

<sup>3</sup> 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

2012). No entanto, estes são aplicados sob a forma de misturas complexas através de bombas costais e muitas vezes sem a devida proteção. Além da exposição aos pesticidas sintéticos, há exposição à nicotina, um alcaloide encontrado na superfície das folhas de tabaco que atua como o pesticida natural da planta. A nicotina é absorvida através da pele quando esta entra em contato com a folha úmida, e na literatura está muito bem documentado o aumento dos níveis de cotinina (principal metabólito da nicotina) em fumicultores, culminando na Doença da Folha Verde (*Green Tobacco Sickness- GTS*), a qual é caracterizada por uma intoxicação aguda (ARCURY et al., 2008).

Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a presença de danos ao DNA em um grupo de indivíduos expostos aos agroquímicos e à nicotina nas lavouras de tabaco (fumicultores) e em um grupo de indivíduos não expostos. Esses dados foram correlacionados com a suscetibilidade individual quanto aos polimorfismos de dois genes da via BER (*XRCC1* e *OGG1*) e de um gene metabolizador de organofosforados (*PON1*).

## **METODOLOGIA**

Este estudo foi aprovado pelo Comitê Nacional de Ética para Pesquisa - CONEP, Brasil (CAAE 35639814.5.0000.5349) e envolveu um total de 242 indivíduos da Região Vale do Rio Pardo- RS. Desses, 121 eram trabalhadores agrícolas ocupacionalmente expostos (anos de exposição:  $28,3 \pm 1,30$ ; média  $\pm$  desvio padrão) a misturas de agroquímicos e à nicotina em campos de tabaco (grupo exposto) e 121 eram trabalhadores de escritórios e varejistas, não ocupacionalmente expostos a nenhum agente genotóxico conhecido (grupo não exposto). Ambos os grupos foram pareados por gênero e idade e todos responderam um questionário aprovado pela Comissão Internacional para a Proteção contra Mutagênicos e Carcinogênicos Ambientais e obteve-se um consentimento informado por escrito de cada um.

As células bucais foram obtidas raspando suavemente o interior das bochechas (lado direito e esquerdo) com uma *cytobrush*, a qual foi imersa em fixador de Saccomano até o processamento do Teste de Micronúcleos no laboratório (THOMAS et al., 2009). Os parâmetros de instabilidade genômica analisados foram a frequência de células Binucleadas (BN) e Micronúcleos (MN) em 2.000 células por indivíduo.

As amostras de sangue foram coletadas por punção venosa. Os níveis de cotinina plasmática foram medidos na amostra de cada indivíduo por HPLC-UV, de acordo com Petersen et al. (2010). Já os elementos inorgânicos, em sangue total, foram analisados por meio do ensaio de emissão de raios X induzida por partículas (PIXE), de acordo com Johansson, Campbell e Malmqvist (1995).

O DNA genômico foi isolado a partir de sangue total pelo método de *salting-out*. Os polimorfismos *PON1*, *XRCC1* e *OGG1* foram genotipados por PCR-RFLP, com as enzimas de restrição *AlwI*, *PvuII* e *Fnu4HI*, respectivamente, conforme descrito na literatura (HUMBERT et al., 1993; DE RUYCK et al., 2007). Os fragmentos foram separados por eletroforese utilizando um gel de poliacrilamida, o qual foi corado com nitrato de prata.

O teste t não pareado e o  $\chi^2$  (teste de Fisher) foram utilizados para comparar as características demográficas e biomarcadores, enquanto que para as diferenças de gênero foi aplicado o teste de Mann-Whitney. O nível crítico para a rejeição da hipótese nula foi considerado como sendo um valor de  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O grupo exposto apresentou aumento significativo dos elementos inorgânicos (Cl, P, S e Zn), assim como maiores níveis séricos de cotinina, quando comparados ao grupo não exposto, confirmando a exposição (biomarcadores de exposição aos agroquímicos e folha de tabaco). Ambos são reconhecidos como xenobióticos causando danos às bases de DNA, incluindo mecanismos de estresse oxidativo (HERNÁNDEZ et al., 2013).

Houve um aumento significativo na instabilidade genômica, indicada pelos maiores índices de MN (homens e mulheres) e BN (mulheres) no grupo exposto, em comparação com o grupo não exposto (Tabela 1). A presença de MN indica danos ao DNA, por perda de fragmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros durante a divisão nuclear, enquanto que BN ocorrem devido falhas na citocinese (THOMAS et al., 2009).

Tabela 1: Parâmetros de instabilidade genômica avaliados pelo teste BMCyt, para grupos não exposto e exposto, analisados em 2.000 células / indivíduo (média  $\pm$  desvio padrão)

Parâmetros do BMCyt	Não exposto (n= 121)	Exposto (n= 121)	Valor de $p^a$
<b>Micronúcleos (MN)</b>	1,2 $\pm$ 0,1	4,8 $\pm$ 0,5	<b>&lt; 0,001</b>
Homens	1,3 $\pm$ 0,1	5,3 $\pm$ 0,7	<b>&lt; 0,001</b>
Mulheres	1,2 $\pm$ 0,2	4,1 $\pm$ 0,5	<b>&lt; 0,001</b>
Valor de $p^b$	0,784	0,215	
<b>Células Binucleadas (BN)</b>	5,4 $\pm$ 0,4	7,2 $\pm$ 0,5	<b>0,010</b>
Homens	7,2 $\pm$ 1,0	5,4 $\pm$ 0,6	0,804
Mulheres	5,3 $\pm$ 0,4	7,8 $\pm$ 0,7	<b>0,005</b>
Valor de $p^b$	0,663	<b>0,019</b>	

<sup>a</sup> Valor de  $p$  entre grupos não exposto e exposto; teste t não pareado; <sup>b</sup> valor de  $p$  entre indivíduos do sexo masculino e feminino dentro de cada grupo; Teste de Mann-Whitney

Em relação à influência dos polimorfismos, dentro do grupo exposto foi observado aumento significativo de MN influenciado pelo *PON1 Gln/Gln* (Tabela 2), quando comparados aos fumicultores com genótipos *PON1 Gln/Arg* ou *Arg/Arg*, demonstrando um efeito de “risco” aos indivíduos portadores desse genótipo. Estudos indicam que este gene desempenha um papel relevante no metabolismo de certos organofosforados e modula sua toxicidade aguda (COSTA et al., 2013).

Tabela 2: Efeitos dos genótipos de metabolização do polimorfismo *PON1 Gln192Arg* sobre os parâmetros do BMCyt avaliados em grupos não exposto e exposto (média ± desvio padrão)

Parâmetros do BMCyt	<i>PON1 Gln192Arg</i>		
	<i>PON1 Gln/Gln</i>	<i>PON1 Gln/Arg</i> ou <i>Arg/Arg</i>	Valor de <i>p</i> <sup>a</sup>
<b>Micronúcleos (MN)</b>			
Não Exposto	1,19 ± 0,2	1,12 ± 0,1	0,818
Exposto	6,26 ± 0,7	3,80 ± 0,6	<b>0,013</b>
<b>Células Binucleadas (BN)</b>			
Não Exposto	5,63 ± 0,5	6,70 ± 0,8	0,953
Exposto	6,62 ± 0,7	8,10 ± 0,8	0,191

<sup>a</sup> valor de *p* entre genótipos do polimorfismo; teste t não pareado

Por fim, ao avaliar os polimorfismos de genes de reparo ao DNA (via BER), dentro do próprio grupo exposto, observou-se redução significativa de MN e BN em indivíduos com genótipo *XRCC1 Arg/Arg*, demonstrando efeito protetor, quando comparados aos fumicultores que eram *XRCC1 Arg/Trp* ou *Trp/Trp* (Tabela 3).

Tabela 3: Efeitos dos genótipos de reparo dos polimorfismos *OGG1 Ser326Cys* e *XRCC1 Arg194Trp* em parâmetros do BMCyt avaliados em grupos não exposto e exposto (média ± desvio padrão)

Parâmetros do BMCyt	<i>OGG1 Ser326Cys</i>			<i>XRCC1 Arg194Trp</i>		
	<i>OGG1 Ser/Ser</i>	<i>OGG1 Ser/Cys</i> ou <i>Cys/Cys</i>	Valor de <i>p</i> <sup>a</sup>	<i>XRCC1 Arg/Arg</i>	<i>XRCC1 Arg/Trp</i> ou <i>Trp/Trp</i>	Valor de <i>p</i> <sup>a</sup>
<b>Micronúcleos (MN)</b>						
Não Exposto	0,53 ± 0,1	0,95 ± 0,2	0,056	1,22 ± 0,1	0,62 ± 0,2	0,103
Exposto	5,71 ± 0,7	5,21 ± 0,8	0,670	4,22 ± 0,5	7,23 ± 1,1	<b>0,044</b>
<b>Células Binucleadas (BN)</b>						
Não Exposto	6,46 ± 0,7	5,38 ± 0,7	0,333	5,93 ± 0,5	7,31 ± 1,7	0,896
Exposto	8,01 ± 0,7	6,93 ± 0,9	0,376	6,20 ± 0,5	10,33 ± 1,2	<b>0,003</b>

<sup>a</sup> Valor de *p* entre genótipos dentro de cada polimorfismo; teste t não pareado

## CONCLUSÕES

Com base nos dados apresentados, é possível verificar evidências de danos genotóxicos devido à exposição ocupacional ao longo prazo por agroquímicos e à nicotina nas

lavouras de tabaco. Ainda, nosso estudo evidencia que os genótipos *PON1 Gln/Gln* e *XRCC1 Trp/-* afetam o aumento na frequência de células micronucleadas, o qual tem relação com o aumento de risco no desenvolvimento de câncer.

## REFERÊNCIAS

ARCURY, T. A.; VALLEJOS, Q. M.; SCHULZ, M. R.; FELDMAN, S. R.; FLEISCHER, A. B. Jr.; VERMA, A.; QUANDT, S. A. Green tobacco sickness and skin integrity among migrant Latino farmworkers. **Am J Ind Med**, v. 51, n. 3, p. 195-203, mar. 2008.

COSTA, L. G.; GIORDANO, G.; COLE, T. B.; MARSILLACH, J.; FURLONG, C. E. Paraoxonase 1 (PON1) as a genetic determinant of susceptibility to organophosphate toxicity, **Toxicology**, v. 307, p. 115-122, mai. 2013.

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, n. 7, p. 525-534, ago. 2012.

DE RUYCK, K.; SZAUMKESSEL, M.; DE RUDDER, I.; DEHOORNE, A.; VRAL, A.; CLAES, K.; VELGHE, A.; VAN MEERBEECK, J.; THIERENS, H. Polymorphism in base-excision repair and nucleotide-excision repair genes in relation to lung cancer risk, **Mutation Research**, v. 631, n. 2, p. 1101-1110, jul. 2007.

HERNÁNDEZ, A. F.; PARRÓN, T.; TSATSAKIS, A. M.; REQUENA, M.; ALARCÓN, R.; LÓPEZ-GUARNIDO, O. Toxic effects of pesticide mixtures at a molecular level: their relevance to human health, **Toxicology**, v. 307, p. 136-145, mai. 2013.

HUMBERT, R.; ADLER, D. A.; DISTECHE, C. M.; HASSETT, C.; OMIECINSKI, C. J.; FURLONG, C. E. The molecular basis of the human serum paraoxonase activity polymorphism, **Nature Genetics**, v. 3, n. 1, p. 73-76, jan. 1993.

JOHANSSON, S. A.; CAMPBELL, J. L.; MALMQVIST, K.G. **Particle-induced X-ray emission spectrometry (PIXE)**, New York: John Wiley and Sons, 1995. 451 p.

KIM, K. H.; KABIR, E.; JAHAN, S. A. Exposure to pesticides and the associated human health effects, **Science of The Total Environment**, v. 575, p. 525-535, jan. 2017.

PETERSEN, G. O.; LEITE, C. E.; CHATKIN, J. M.; THIESEN, F. V. Cotinine as a biomarker of tobacco exposure: development of a HPLC method and comparison of matrices, **Journal of Separation Science**, v. 33, p. 516-521, mar. 2010.

THOMAS, P.; HOLLAND, N.; BOLOGNESI, C.; KIRSCH-VOLDERS, M.; BONASSI, S.; ZIEGER, E.; KNASMUELLER, S.; FENECH, M. Buccal micronucleus Cytome assay, **Nature Protocols**, v. 4, n. 6, p. 825-837, mai. 2009.