



AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE E A INFLUÊNCIA DE POLIMORFISMO GENÉTICO EM SOJICULTORES EXPOSTOS A UMA MISTURA COMPLEXA DE AGROQUÍMICOS.

Caroline Nicolau¹
Danieli Benedetti²
Juliana Da Silva³

Resumo

O crescimento na demanda da soja intensificou a necessidade do uso de agroquímicos, para evitar a propagação de pragas nas plantações. Os efeitos do uso dos agroquímicos cronicamente ainda não são totalmente conhecidos, sendo necessários estudos mais aprofundados. Uma ferramenta importante para o conhecimento dessas implicações é o Teste de Micronúcleo que busca avaliar os efeitos genotóxicos. Avaliar a influência do gene *PONI* sobre esses danos ajuda na compreensão da variabilidade de resposta dos indivíduos. Foram avaliados 170 indivíduos residentes do município de Espumoso, sendo 115 do grupo exposto e 55 do não exposto. Através do teste de Micronúcleos em Mucosa Oral é possível perceber aumento significativo de danos ao DNA, através do aumento de células micronucleadas e com BUD nuclear/broken eggs, e ainda houve um aumento significativo de morte celular entre os indivíduos expostos em relação aos não expostos. Foi percebido aumento significativo de micronúcleos entre indivíduos expostos com genótipo *PONI Gln/Gln*. Esses resultados alertam sobre o risco genético relacionado à exposição resultante do uso intensivo de agroquímicos e a influência de genes de metabolização que parecem estabelecer importante função na instabilidade genômica.

Palavras chave: Sojicultura; Agroquímicos; Genotoxicidade.

INTRODUÇÃO

A soja é uma planta herbácea pertencente à família das Leguminosas que é considerada uma excelente fonte de proteínas e óleos, assim, possui grande importância para a alimentação humana e animal. O Brasil é o segundo maior exportador e produtor de soja do mundo, sendo a região Sul e Centro-Oeste uma das principais produtoras.

A soja, como monocultivo, requer a aplicação de uma ampla combinação de agrotóxicos (fungicidas, herbicidas e inseticidas) e fertilizantes, considerados indispensáveis para manter a sanidade durante o desenvolvimento da planta e livrar a plantação de insetos e pragas.

Os sojicultores dessa região estão cada vez mais expostos a uma ampla combinação de agentes químicos presentes em formulações de agrotóxicos. Em altas doses, os agrotóxicos

¹ Aluna do curso de graduação Biomedicina – Bolsista PIBIT/CNPq – caroline_nicolau@hotmail.com

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

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

agem de maneira eficiente na proteção das plantas, porém em humanos, podem causar intoxicação aguda, que compreendem em geral, náuseas, vômitos, fadiga, tontura, efeitos respiratórios e neurológicos, considerados graves (MARONI et al., 2000) e também danos ao DNA, que quando acumulados dão origem às mutações e assim podem desencadear doenças crônicas, incluindo uma variedade de tipos de câncer, doenças degenerativas, imunes, hematológicas, neurológicas e endócrinas.

A variabilidade genética individual, envolvida nas transformações metabólicas dos agrotóxicos, pode influenciar os efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos e, portanto, os processos fisiopatológicos, uma vez que o metabolismo compreende uma grande família de multigenes, e por isso, é importante avaliar a influência de alguns polimorfismos em genes envolvidos na metabolização de agrotóxicos, como *PON1Gln192Arg* (envolvido no metabolismo de organofosforados).

Uma ferramenta importante para o biomonitoramento dos sojicultores é o Teste de Micronúcleos em Mucosa Oral, este teste detecta pequenos núcleos adicionais, que são resultado da quebra parcial ou inteira de um cromossomo decorrente de um dano genético. Esses danos podem ser causados por agentes físicos, químicos ou biológicos, que possam interferir na mitose. Esta ferramenta é capaz de identificar mutagênese, aneugênese e danos no fuso mitótico causados por agroquímicos nos indivíduos.

O objetivo do estudo é a avaliação de possíveis efeitos genotóxicos da exposição ocupacional aos agrotóxicos entre os sojicultores do município de Espumoso (Rio Grande do Sul – Brasil), por meio do Teste de Micronúcleos em Mucosa Oral e verificar a influência do gene de metabolismo *PON1* nos danos ao DNA.

METODOLOGIA

A pesquisa foi realizada com 170 indivíduos (sexo masculino) residentes no município de Espumoso. 115 foram de indivíduos ocupacionalmente expostos aos agrotóxicos durante o plantio de soja, e 55 foram do grupo não exposto. O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Luterana do Brasil (ULBRA - Canoas), sendo o número do parecer de aprovação 184.557. Foi realizado um questionário completo estimando, sexo, idade, hábitos de vida (fumante, consumidor de bebidas alcoólicas, doenças crônicas, uso de medicamentos), ocupação, etc.

Foi realizado teste de micronúcleos em mucosa oral (BMCyt) onde foram coletadas a mucosa oral dos indivíduos com *cytobrush*, imersa em solução de salina em tubo cônico,

transportado ao laboratório onde foram feitas as centrifugações, lavagens e preparadas as lâminas. Em seguida foram coradas com reagente de Schiff. Foram avaliados células diferenciadas com micronúcleo, BUD/*broken-egg*, basal, binucleada, cromatina condensada, cariorrética, picnótica e cariolítica.

A detecção do genótipo para o gene *PON1Gln192Arg* foi desenvolvida a partir de uma extração de DNA, realizada como descrito por Lahiri & Nurnberger (1991) e a detecção dos polimorfismos foram analisados através da técnica de PCR. A visualização dos genótipos foi feita em gel de poliacrilamida 40% corado com nitrato de prata.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A idade média dos indivíduos do grupo não exposto foi de $48 \pm 11,8$ e do grupo exposto foi de $50 \pm 10,4$, assim como mostra na tabela 1.

Tabela 1: Características dos indivíduos expostos e não expostos

	Não Exposto	Exposto
Numero de indivíduos	55	115
Idade a	$48 \pm 11,8$	$50 \pm 10,4$
Gênero	Masculino	Masculino

^a média \pm desvio padrão.

Através do teste de Micronúcleos em Mucosa Oral é possível perceber aumento significativo de defeitos no fuso mitótico por células binucleadas entre o grupo exposto e ainda danos de DNA através do aumento de células micronucleadas e com BUD nuclear/*broken eggs*, como mostrado na Tabela 2. A mesma tabela também revela morte celular significativamente maior entre os indivíduos expostos em relação aos não expostos, com aumento de células cariorréticas, picnóticas e cariolíticas neste grupo.

Alguns polimorfismos podem afetar a instabilidade cromossômica contribuindo mudanças no controle da proliferação e diferenciação celular que envolve a apoptose. A morte celular aumentada entre os indivíduos expostos pode estar associada com o polimorfismo *PON1Gln192Arg*, mas esta informação exige um estudo e uma análise mais detalhada e precisa.

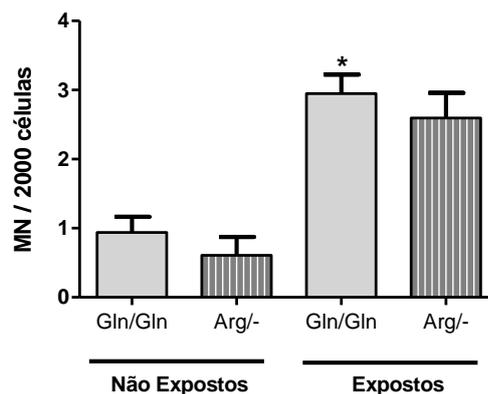
Tabela 2: Análise de células com Danos de DNA e diferentes estágios de morte celular através do Ensaio de Micronúcleos em Mucosa Oral (BMCyt).

BMNCyt1 (2.000 células)	Não expostos	Expostos
Células Basais	7.1 ± 8.6	7.8 ± 6.7
Micronúcleos	0.6 ± 1.0	2.8 ± 2.2***
BUD nuclear / broken eggs	1.0 ± 0.2	4.3 ± 0.3***
Células Binucleadas	3.5 ± 4.7	7.6 ± 5.6***
Cromatina Condensada	9.3 ± 5.6	11.3 ± 7.9
Células Cariorréticas	9.0 ± 5.3	13.6 ± 9.0***
Células Picnóticas	1.3 ± 1.8	3.5 ± 3.5 ***
Células Cariolíticas	5.3 ± 4.3	9.8 ± 7.1***

Significante *** P<0.0001 em relação aos grupos não expostos e expostos. Teste Mann–Whitney.

Foi percebido aumento significativo de micronúcleos entre indivíduos expostos com genótipo *PON1*Gln/Gln, conforme mostrado na figura abaixo.

Figura 1: Efeito dos genótipos do gene *PON1* no Teste de Micronúcleos em Mucosa Oral. Teste Mann–Whitney.



CONCLUSÕES

Apesar de existir muitos estudos na literatura associando efeitos agudos e crônicos relacionados à exposição humana aos agroquímicos ainda são insuficientes estudos que avaliem processos mutagênicos relacionados a alguns genes de metabolismo como *PON1*

entre os sojicultores. Nosso estudo, demonstrou a presença de efeito mutagênico e morte celular em células da mucosa oral de trabalhadores rurais expostos a diferentes classes de agroquímicos durante o plantio da soja, principalmente aos carbamatos e organofosforados. Além disso, é possível perceber a influência do genótipo em *PONI* durante o metabolismo de organofosforados e carbamatos e seu efeito sobre o dano no DNA entre os indivíduos expostos. Esses resultados alertam sobre o risco genético relacionado à exposição resultante do uso intensivo de agroquímicos e a influência de genes de metabolização que parecem estabelecer importante função na instabilidade genômica, por isso é necessário enfatizar que medidas prioritárias como uso de equipamentos de segurança, educação sobre o uso e consumo de agroquímicos, entre outras formas de intervenção devam ser estabelecidas, afim de preservar a saúde do trabalhador rural e diminuir o risco ocupacional durante o uso de agroquímicos.

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.
- CARRARD, Vinicius Coelho [et al.], Teste dos Micronúcleos – Um Biomarcador de Dano Genotóxico em Células Descamadas da Mucosa Bucal. **Revista de Odontologia**, v. 48, n. 1/3, 2007.
- LAHIRI, D.K; NURNBERGER, J.I.JR. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic Acids Res**, 19: 444, 1991.
- MARONI, C; COLOSIO, C; FERIOLI, A; FAIT, A. Biological monitoring of pesticide exposure: a review. **Toxicology**, 143, 1-118, 2000.
- SILVA, Juliana da; FONSECA, Miriam B. da. **Estudos Toxicológicos no Ambiente e na Saúde Humana**. In: Henriques, João A.P.; Erdtmann, Bernardo; Silva, Juliana da. *Genética Toxicológica*. Porto Alegre: Alcance, 2003.