

AVALIAÇÃO DE MICRONÚCLEOS E OUTRAS ALTERAÇÕES NUCLEARES EM CÉLULAS ESFOLIADAS DA MUCOSA BUCAL DE AGRICULTORES E CONSUMIDORES DE HORTALIÇAS

Brisa Raíssa Bartellt GODOY¹, Aline Mocellin CONTE², Bruna GOVONI³, Jane Marlei BOEIRA⁴

¹ Bolsista de iniciação científica Inicie - Uergs. Curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. Unidade em Novo Hamburgo. Universidade Estadual do Rio Grande do Sul (UERGS); ² Bolsista de iniciação científica Inicie - Uergs. Curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. Unidade em Porto Alegre. UERGS; ³ Bolsista de extensão. Curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. Unidade em Porto Alegre. UERGS; ⁴ Profa. Orientadora. Unidade em Porto Alegre. UERGS.

E-mails: brisa-godoy@uergs.edu.br; aline-conte@uergs.edu.br; bruna-govoni@uergs.edu.br; jane-boeira@uergs.edu.br

Resumo

O Brasil é um dos maiores consumidores de agrotóxicos. Devido aos riscos à saúde pública, este estudo objetivou avaliar a genotoxicidade de agrotóxicos em células esfoliadas da mucosa bucal de agricultores e de consumidores de alimentos contendo resíduos de agrotóxicos, através do teste de micronúcleos. Os participantes assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e responderam um questionário, após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (UERGS). A coleta de células foi realizada conforme Hernandez *et al.* (2016). Os resultados mostraram maior frequência de micronúcleos e de células em morte no grupo dos agricultores, comparado ao grupo controle. Os indivíduos que relataram casos de câncer familiar também mostraram maior frequência de micronúcleos e alterações nucleares. Dessa forma, neste estudo pôde-se estabelecer a correlação entre os efeitos carcinogênicos e mutagênicos dos agrotóxicos e a maior incidência de alterações celulares nos indivíduos expostos a estas substâncias.

INTRODUÇÃO

Amplamente utilizados pelo homem, os pesticidas podem ser definidos como substâncias químicas ou biológicas aplicadas com o intuito de conferir proteção às lavouras contra o ataque e a proliferação de pragas, como ervas daninhas, fungos, bactérias, vírus e insetos (LOBO & BOLAÑOS, 2014). A utilização dessas substâncias tem aumentado a cada ano e o Brasil é um dos países que mais consomem estes produtos (BALLESTRERI, 2017).

Apesar de apresentarem importante papel para a agricultura, os pesticidas são substâncias genotóxicas com capacidade de induzir danos no DNA (COSTA & TEIXEIRA, 2012). Para avaliar estes danos são necessários realizar estudos de biomonitoramento, que avaliam os efeitos que os agrotóxicos causam em uma população exposta, a curto prazo, como o Teste de Micronúcleos (CORRÊA *et al.*, 2009).

Diante disso, este estudo teve como objetivo avaliar a genotoxicidade de agrotóxicos através do ensaio de micronúcleos e outras alterações nucleares (binucleação, broto nuclear, cariorréxe, cromatina condensada, picnose e cariólise) em células esfoliadas da mucosa bucal de indivíduos expostos diretamente pela exposição ocupacional ou pela alimentação de hortaliças contendo resíduos de agrotóxicos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Uergs, CEP-Uergs (CAAE - 66075317.0.0000.8091, com o título original “Promoção da Saúde do Agricultor Através do Biomonitoramento do Efeito Genotóxico da Exposição aos Agrotóxicos”) e seguiu todas as Normas das Resoluções vigentes da Ética em Pesquisa. Todos os indivíduos convidados a

participar da pesquisa assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e, após responderam um questionário com informações a respeito da idade, sexo, hábito de fumar, frequência de ingestão de bebidas alcoólicas, histórico de câncer familiar, tempo de exposição ocupacional aos agrotóxicos, entre outras informações. Foram excluídos da pesquisa os participantes expostos à outras substâncias químicas potencialmente genotóxicas. Participaram 120 indivíduos divididos em 3 grupos: a) 40 consumidores de produtos ditos orgânicos (controle); b) 40 consumidores de hortaliças produzidas por agricultura convencional (exposição indireta) e c) 40 agricultores, expostos diretamente aos agrotóxicos.

Células esfoliadas da mucosa bucal dos indivíduos foram coletadas de acordo com *Hernandes et al* (2016). As células foram centrifugadas para lavagens sucessivas com solução Carnoy (etanol/ácido acético; 3:1), para a retirada de micro-organismos e resíduos indesejáveis. Após, as lâminas foram preparadas com o material celular e tratadas com solução ácida de HCl 5M (20 min), para hidrólise do material biológico. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água corrente (por 10 min) e secas a temperatura ambiente. Para coloração, as lâminas foram tratadas com reagente de Schiff, (1h30 min), contra coradas com fast-green ácido (1 min) e secas a temperatura ambiente. Para cada indivíduo, foram preparadas três lâminas e analisadas 1.000 células, ao Microscópio Óptico (Nikon®), para avaliação de MN e de outras anormalidades nucleares. A análise foi realizada em teste cego, por dois observadores treinados, para realizar as médias das leituras. As células foram classificadas em basais e diferenciadas. Para as basais foram consideradas as células com núcleo grande e oval, e para as diferenciadas, as células com núcleo pequeno e mais central. Foram analisadas apenas as células com os núcleos intactos, não sobrepostas ou dobradas, com perímetro nuclear liso, que apresentavam o citoplasma também intacto. A contagem dos MN, assim como das demais alterações nucleares foi realizada de acordo com o protocolo proposto por *Thomas et al.* (2009).

A análise estatística foi realizada com o software GraphPad Prism 3.0. Os resultados das análises microscópicas foram apresentados em média $\pm$ erro padrão. A distribuição dos dados foi testada utilizando o teste Kolmogorov-Smirnov, para determinar se os dados seguem uma distribuição normal. Para avaliar as diferenças nas médias das idades dos grupos, foi utilizado o teste ANOVA. Os dados obtidos em cada anormalidade nuclear, por não apresentarem distribuição normal, foram analisados pelo teste Kruskal-Wallis, seguido de Dunn's, para comparações entre os grupos. Os dados foram considerados significativos quando $P < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os indivíduos dos grupos estudados não apresentaram diferenças significativas em relação à idade (ANOVA; $P = 0,0857$). O grupo controle apresentou uma média de idade de 43,13 anos, variando entre 20 e 67 anos. Os consumidores de hortaliças de cultivo convencional apresentaram uma média de idade de 38,63 anos, variando entre 20 e 77 anos, enquanto o grupo dos agricultores apresentou uma média de idade de 45,65 anos, com variação de 21 a 76 anos. Através da análise dos questionários respondidos pelos participantes, obteve-se também dados acerca do hábito de fumar e de ingerir bebidas alcoólicas. O grupo controle apresentou um total de 5 indivíduos com hábito de fumar e 22 participantes com hábito de ingerir bebidas alcoólicas. No grupo dos consumidores de hortaliças de cultivo convencional, 4 participantes informaram ter hábito de fumar e 12 com o hábito de ingerir bebidas alcoólicas. Já entre os agricultores, 6 indivíduos informaram hábito de fumar e 25 que ingeriam bebidas alcoólicas. Foi considerado fumante o indivíduo que fumava pelo menos um maço de cigarro por dia e para o hábito de ingerir bebidas alcoólicas, aqueles que ingeriram, pelo menos um copo, por pelo menos 2 dias, semanalmente.

A partir da contagem, ao microscópio óptico, de 1.000 células por indivíduo, obteve-se as frequências de células basais (normais e com micronúcleos) e células diferenciadas com micronúcleos e outros danos nucleares (Tabela 1). O grupo dos agricultores apresentou aumento significativo ($P < 0,001$) da frequência de MN ($1,52 \pm 0,34$), quando em comparação com os consumidores de hortaliças de cultivo convencional ($0,55 \pm 0,15$) e o grupo controle ($0,02 \pm 0,02$). Resultados similares foram observados por Remor *et al.* (2009) em trabalhadores rurais dos municípios de Erechim e de Ijuí (RS), que mostraram uma frequência significativa de MN de $0,76 \pm 0,68$ (média $\pm$ desvio padrão) nos trabalhadores rurais, em comparação com o controle ($0,55 \pm 0,69$; média $\pm$ desvio padrão). Os agricultores também apresentaram aumentos significativos nas frequências de células com picnose ($5,30 \pm 0,61$; $P < 0,001$), com cromatina condensada ($3,55 \pm 0,49$; $P < 0,01$) e cariólise ($7,37 \pm 0,55$; $P < 0,001$) em comparação ao grupo controle. Os consumidores convencionais apresentaram aumento significativo apenas na frequência de cariólise ($6,50 \pm 0,92$; $P < 0,001$) e de células binucleadas ($1,10 \pm 0,23$; $P < 0,05$). Não houve diferença significativa entre a média de cariorrexe dos três grupos. Estes dados estão de acordo com Benedetti *et al.* (2013), que sugerem que os danos genéticos causados pela exposição a pesticidas podem levar a um aumento de células com morte celular, induzidas por mecanismos que atuam de forma a promover a eliminação de células geneticamente danificadas.

Tabela 1 – Alterações nucleares (média $\pm$ erro padrão) em células basais e diferenciadas do epitélio esfoliado da mucosa bucal de consumidores orgânicos, convencionais e agricultores.

Parâmetros		CO ^a (n = 40)	CC ^b (n = 40)	Agricultores (n = 40)
Células Basais	Normais	31,50 $\pm$ 0,96	27,80 $\pm$ 3,85	35,18 $\pm$ 5,54
	MN	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
Células Diferenciadas				
Danos no DNA	MN	0,02 $\pm$ 0,02	0,55 $\pm$ 0,15	1,52 $\pm$ 0,34***
	Brotos nucleares	0,07 $\pm$ 0,04	0,50 $\pm$ 0,15	0,67 $\pm$ 0,15*
Citotoxicidade	Binucleadas	0,25 $\pm$ 0,07	1,10 $\pm$ 0,23*	0,92 $\pm$ 0,24
Morte celular	Cariorrexe	0,52 $\pm$ 0,13	1,25 $\pm$ 0,26	0,82 $\pm$ 0,22
	Picnose	0,92 $\pm$ 0,26	1,47 $\pm$ 0,40	5,30 $\pm$ 0,61***
	Cromatina condensada	1,25 $\pm$ 0,21	1,20 $\pm$ 0,27	3,55 $\pm$ 0,49**
	Cariólise	1,72 $\pm$ 0,43	6,50 $\pm$ 0,92***	7,37 $\pm$ 0,55***

Legenda: a: CO - Consumidor Orgânico (Controle); b: CC – Consumidor Convencional; *Significante a nível de $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$, avaliado pelo teste Kruskal-Wallis (não-paramétrico) seguido de Dunn's, para comparações múltiplas.

Dados dos questionários mostraram que os principais agrotóxicos usados foram Roundup (Glifosato) por 45% dos agricultores, o Tordon ou Mannejo (Picloram + 2,4D), por 7,5%, o Bravonil e Dacobre (Clorotalonil) e o Tamaron ou o Fersol (Metamidofós) foram relatados por 5%, enquanto que Malathion 500 EC (Malation) por 2,5% dos agricultores. Destes, somente os dois últimos não apresentam potencial carcinogênico. Além disto, os indivíduos que relataram casos de câncer familiar também mostraram maior frequência de micronúcleos e alterações nucleares (dados não mostrados). Portanto, estes resultados nos indicam que os agrotóxicos usados pelos agricultores são potencialmente genotóxicos.

Portanto, neste estudo foi possível relacionar os efeitos dos agrotóxicos nos agricultores e nos consumidores. Nos agricultores, não se pôde realizar uma relação entre os danos celulares observados a apenas uma única classe de agrotóxicos, pois a maioria dos agricultores relatou a utilização de produtos cujas formulações são misturas ou que usam muitos defensivos agrícolas de forma alternada. De acordo com Pereira *et al.* (2017), as maiores incidências de intoxicações

agudas por agrotóxicos ocorrem em indivíduos expostos, mas também podem ocorrer casos de intoxicações crônicas, afetando a população como um todo, devido a ingestão de alimentos contendo resíduos de agrotóxicos. Portanto, os danos celulares encontrados nos consumidores de alimentos de cultivo convencional podem ser decorrentes de resíduos de agrotóxicos nos alimentos, não somente em produtos de origem natural, mas em alimentos processados, tais como cereais, pães, biscoitos e outros produtos que apresentam na sua composição ingredientes como o trigo, a soja e o milho. Além disso, produtos de origem animal também podem conter traços de pesticidas. Dessa forma, foi também possível relacionar o aumento de alterações nucleares encontradas nas células dos consumidores de alimentos cultivados com pesticidas potencialmente genotóxicos.

CONCLUSÕES

Frente ao exposto pode-se concluir que as maiores frequências de MN, assim como de alterações nucleares decorrentes de mecanismos de morte celular, foram encontradas nos agricultores e nos consumidores de alimentos de origem convencional. Através dos dados obtidos, pode-se estabelecer a correlação entre os efeitos carcinogênicos e mutagênicos de agrotóxicos utilizados pela maioria dos agricultores participantes deste estudo e a maior incidência de alterações celulares nestes indivíduos.

AGRADECIMENTOS: este estudo foi financiado pelo PROEXT/MEC 2015 e também contou com bolsas IniCie/UERGS (PROPPG, em 2018), PROBEX/UERGS (Proex, em 2018) e Bolsas PROEXT/MEC (em 2017).

REFERÊNCIAS

- BALLESTRERI, E. *Revinter*, v. 10, 19-28, 2017.
- CORRÊA, N. S. *et al. Ciência & Saúde Coletiva*, v. 14, 2251-2260, 2009.
- COSTA, C. & TEIXEIRA, J. P. *Revista de Ciências Agrárias*, v. 2, 19-31, 2012.
- HERNANDES, K. C. *et al. Revista Eletrônica Científica Uergs*, v. 2, n. 3, 267-275, 2016.
- LOBO, T.M. & BOLAÑOS, A. *Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud*, v. 2, 18-26, 2014.
- PEREIRA, V. G. M. *et al. Revista Gestão em Foco*, v. 9, 2017.
- TOLBERT, P. E. *et al. Mutation Research*, v. 271, 69-77, 1992.
- REMOR, A. P. *et al. Environment International*, v. 35, 273-278, 2009.