

Anais do XIV Seminário de Iniciação Científica da Universidade Estadual de Feira de Santana, UEFS,  
Feira de Santana, 18 a 22 de outubro de 2010

## **AValiação DO POTENCIAL GENOTÓXICO DE AGROTÓXICOS UTILIZADOS NA PRÁTICA AGRÍCOLA EM PONTO NOVO/BA COM O USO DO TESTE DE MICRONÚCLEO.**

**Bruno Sousa Pereira<sup>1</sup> e José Roberto Cardoso Meireles<sup>2</sup>**

1. Bolsista FAPESB, Graduando em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail:

[brunnobala@hotmail.com](mailto:brunnobala@hotmail.com)

2. Orientador, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail:

[jrcmeireles@gmail.com](mailto:jrcmeireles@gmail.com)

**PALAVRAS-CHAVE:** micronúcleo, apoptose, agrotóxicos

### **INTRODUÇÃO**

Em estudos epidemiológicos tem sido evidenciado aumento sistemático de tumores entre agricultores e indivíduos relacionados ao manuseio frequente de agrotóxicos (Blair *et al.*, 2005), estes dados podem estar relacionados o uso extensivo de agrotóxicos, pois são considerados agentes mutagênicos e os potenciais responsáveis pelo número elevado de casos tipicamente carcinogênicos (Rodrigues *et al.*, 1999).

A exposição a agrotóxicos tem sido apontada por estudos epidemiológicos como um dos fatores ambientais responsáveis pela alta incidência de câncer em populações rurais (Stoppelli, 2005). Sendo o câncer uma doença genética causada por mutações em genes envolvidos no controle do ciclo celular, avaliar as condições de exposição de agricultores a estes produtos, quanto à genotoxicidade, é de fundamental importância para que medidas preventivas possam ser adotadas.

Assim, o presente estudo objetivou avaliar os efeitos genotóxicos de agrotóxicos utilizando o Teste de Micronúcleo em células esfoliadas, incluindo a observação de alterações indicativas de apoptose (cariorréxis, picnose e cromatina condensada), da mucosa oral de agricultores do perímetro irrigado de Ponto Novo/BA.

### **METODOLOGIA**

*Área de estudo:* o estudo foi realizado em Ponto Novo/BA, município situado ao norte do estado da Bahia, na BR-407. A população rural é composta predominantemente por agricultores que fazem parte do projeto de irrigação que dista 1 km da sede do município.

*Amostra:* no grupo amostral do presente estudo foram incluídos 90 indivíduos distribuídos em dois grupos: Grupo Exposto (GE), constituído por 45 indivíduos expostos ocupacionalmente a agrotóxicos e Grupo Controle (GC), no qual foram selecionados 45 indivíduos que residem fora do perímetro irrigado e sem história de exposição a agrotóxico. Ambos os grupos amostrais foram compostos por igual número de homens e mulheres (28 homens e 17 mulheres). Toda amostra foi pareada em relação ao gênero e à idade, ou seja para cada indivíduo do grupo exposto houve um no grupo controle do mesmo gênero e da mesma faixa de idade.

*Caracterização da Amostra:* a amostra foi caracterizada pela aplicação de questionário contendo indagações a respeito de idade, sexo, ocupação atual e anterior, tempo de atividade, hábitos de fumar, ingestão de bebidas alcoólicas, uso de medicamentos, exposição à radiação e a produtos tóxicos, tipo e tempo de exposição, histórico de câncer na família e uso de medidas protetoras. Foram considerados fumantes os indivíduos que fumam cigarros regularmente por um período mínimo de um ano ou mais e não fumantes os que nunca fizeram uso cigarros, os abstinentes do hábito por no mínimo cinco anos. Os indivíduos que faziam ingestão de bebidas alcoólicas pelo menos uma vez por semana foram considerados consumidores deste tipo de bebida.

Anais do XIV Seminário de Iniciação Científica da Universidade Estadual de Feira de Santana, UEFS, Feira de Santana, 18 a 22 de outubro de 2010

*Obtenção do Material para Estudo Citogenético:* o material biológico utilizado no estudo foram células da mucosa bucal. Este material foi coletado por raspagem gentil da mucosa bucal com uso de escova endocervical.

*Preparações para a Análise Citogenética:* o material coletado com auxílio da escova endocervical foi transferido, por esfregaço, para lâmina de microscopia rigorosamente lavada e seca contendo duas gotas de soro fisiológico (NaCl 0,09%). Após secagem à temperatura ambiente as preparações foram submersas em solução de metanol/ácido acético (3:1) para fixação. Vinte e quatro horas depois foram coradas com reativo de Shift e *fast green* a 1% em álcool absoluto por 1 minuto.

*Análise Citogenética:* toda análise foi realizada em teste cego com relação aos dados do questionário. Um total de 2.000 células por indivíduo foi analisado. Os critérios de identificação de micronúcleo adotados estão de acordo com os descritos por Sarto *et al.* (1987) e Tolbert *et al.* (1992): foram considerados micronúcleos, estruturas com distribuição cromatínica e coloração igual (ou mais clara) a do núcleo, visualizadas no mesmo plano deste, com limites definidos e semelhantes aos nucleares, e tamanho até 1/3 do núcleo. Somente células com citoplasma íntegro foram computadas. Células apresentando fenômenos degenerativos do nucleares (picnose, cromatina condensada, cariorréxis e cariólise) também foram incluídas na contagem.

*Análise Estatística:* a análise foi realizada com o uso do teste condicional para comparação de proporções em situações de eventos raros (Bragança-Pereira, 1991).

*Aspectos Éticos:* a metodologia aplicada para obtenção das células da mucosa oral não é um procedimento invasivo (raspagem superficial da mucosa) e foi realizada com material (escova endocervical) descartável que não oferece risco de lesão ou contaminação dos indivíduos da amostra. Todas as pessoas da amostra foram esclarecidas a respeito da pesquisa e tiveram total liberdade para não participar ou desistir no momento que lhes fosse conveniente. Aquelas que concordaram em participar do estudo assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. A pesquisa teve início após a aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Feira de Santana (CAAE-0121.0.059.000-06).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

*Características da amostra:* a média de idade dos indivíduos do GE foi de  $25,7 \pm 9,6$  e do GC de  $25,5 \pm 10,18$ . Dois indivíduos (no GE) foram classificados como fumantes, informam o uso de um a cinco cigarros diários. A ingestão de bebidas alcoólicas foi informada por doze entrevistados do GE, sendo que cinco referiram uso pelo menos uma vez a cada mês, três informaram consumo de bebida alcoólica uma vez por semana e quatro relataram ingestão deste tipo de bebida raramente ou ocasionalmente. A cerveja foi à bebida alcoólica de consumo mais frequente, apenas um dos indivíduos afirmou consumir outro tipo de bebida alcoólica (conhaque). Nenhum entrevistado do GC declarou hábito de fumar e/ou ingestão de bebida alcoólica. As características da amostra estão sumarizadas na tabela 1.

	Grupo	Exposto	Controle
Características			
Média de Idade		$25,7 \pm 9,6$	$25,5 \pm 10,18$
Gênero			
	Masculino	28	28
	Feminino	17	17

Anais do XIV Seminário de Iniciação Científica da Universidade Estadual de Feira de Santana, UEFS,  
Feira de Santana, 18 a 22 de outubro de 2010

Hábito de fumar		
Não fumantes	43	0
Fumantes	2	0
Consumo de bebida alcoólica		
Consumidores	12	0
Não-Consumidores	33	0

Tabela 1. Características dos indivíduos do grupo exposto e controle

*Análise citogenética:* um total de 180.000 células foi analisado: 90.000 dos indivíduos do GE e igual quantidade para o GC. A figura 1 apresenta fotomicrografias de células que foram analisadas.

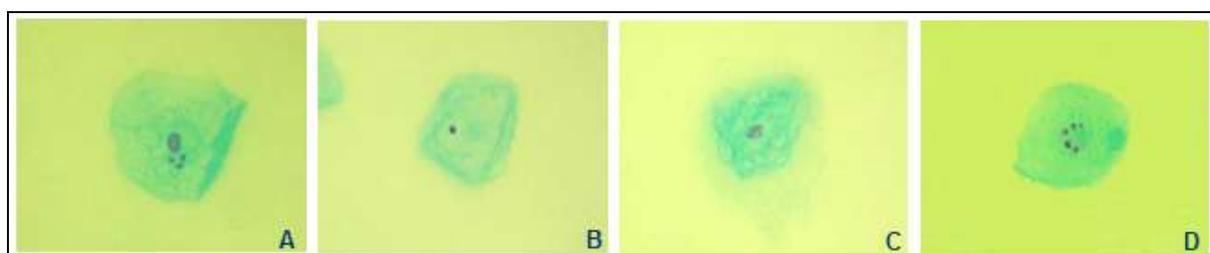


Figura 1: Fotomicrografias de preparações de células esfoliadas da mucosa oral corada pelo método Feulgen/Fast green apresentando micronúcleo (A), picnose (B), cromatina condensada (C) e cariorrex (D).

A análise estatística comparando a frequência de micronúcleo e alterações degenerativas do núcleo entre os GC e GE, mostrou que a ocorrência destes marcadores foi significativamente maior nos indivíduos do GE (tabela 2).

Tabela 2. Ocorrência de alterações genética nos grupos amostrais em relação à exposição e a não exposição a agrotóxicos.

Marcador citogenético	GC		GE		Parâmetros estatísticos		
	OBS.	ESP.	OBS.	ESP.	GL	$\chi^2$	P
MN	59	79,5	100	79,5	1	10,6	< 0,01
Picnose	772	719	662	719	1	9,0	< 0,01
C. condensada	1512	1823	2134	1823	1	106,1	< 0,0001
Cariorex	2516	1965,5	1415	1965,5	1	308,3	< 0,0001

OBS = observado; ESP. = esperado; GL = Graus de liberdade

A maior frequência de micronúcleo observada nos indivíduos do GE pode ser atribuída ao contato ocupacional e/ou ambiental a agrotóxicos, uma vez que os dois grupos não diferiram quanto aos demais aspectos, como hábito de fumar e ingerir bebidas alcoólicas. Este resultado confirma o potencial genotóxico dos agrotóxicos, como evidenciado por diversos autores (Gómez-Arroyo *et al.*, 2000; Pacheco & Hackel, 2001; Martinez *et al.*, 2005).

Além da eficácia na análise de micronúcleos, outro relevante aspecto a ser considerado neste estudo, foi a elevada ocorrência de picnose, cromatina condensada, cariorrêxis e cariólise no GE. Segundo Tolbert, Shy & Allen (1991), a elevada frequência destas alterações nucleares são indicativas de injúria celular. Estes dados evidenciam a importância da aplicação de protocolo diferenciado em tecidos escamativos, caracterizando núcleos com

Anais do XIV Seminário de Iniciação Científica da Universidade Estadual de Feira de Santana, UEFS, Feira de Santana, 18 a 22 de outubro de 2010

morfologia relacionadas a genotoxicidade e citotoxicidade que são importantes marcadores da iniciação e promoção da carcinogênese (Tolbert, Shy & Allen, 1991).

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante do exposto, os resultados deste estudo corroboram com aqueles que identificaram ação danosa dos agrotóxicos sobre o material genético. Desse modo, é necessário que medidas preventivas como: uso de equipamentos de proteção pelos trabalhadores, armazenamento adequado e uso racional dos agrotóxicos sejam adotadas. Assim tornar o ambiente de trabalho e residencial no campo mais salutar.

## REFERÊNCIAS

- BLAIR, A.; SANDLER, D. P.; TARONE, R.; LUBIN, J.; THOMAS, K.; HOPPIN, J. A.; SAMANIC, C.; COBLE, J.; KAMEL, F.; KNOTT, C.; DOSEMECI, M.; ZAHM, S. H.; LYNCH, C. F.; ROTHMAN, N.; ALAVANJA, M. C. 2005. Mortality among participants in the agricultural health study. *Ann. Epidemiol.* 15(4): 279-285.
- BRAGANÇA-PEREIRA, C. A. 1999. Teste estatístico para comparar proporções em problemas de citogenética. In: RABELLO-GAY, M.N., RODRIGUES, M. A. LA. R., MAONTELEONE NETO, R. Mutagênese, carcinogênese e teratogênese: Métodos e critérios de avaliação. São Paulo: Sociedade Brasileira de Genética.
- GÓMEZ-ARROYO, S.; DIAZ-SANCHEZ, Y.; MENESES-PEREZ, M. A.; VILLALOBOS-PIETRINI, R.; DE LEON-RODRIGUEZ, J. 2000. Cytogenetic biomonitoring in a Mexican floriculture worker group exposed to pesticides. *Mutat. Res.* 466(5): 117-124.
- MARTÍNEZ, V.; CREUS, A.; VENEGAS, W.; ARROYO, A.; BECK, J. P.; GEBEL, T. W.; SURRALLÉS, J.; MARCOS, R. 2005. Micronuclei assessment in buccal cells of people environmentally exposed to arsenic in northern. *Toxicology Letters.* 155(2): 319-327.
- PACHECO, A. O. E.; HACKEL, C. 2001. Instabilidade cromossômica induzida por agroquímicos em trabalhadores rurais na região de Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brasil. *Caderno de Saúde Pública.* 8(6): 1675-1683.
- RODRIGUES, G.S. 1999. Bioensaios de toxicidade genética com Tradescantia. Jaquariúna: Embrapa Meio Ambiente, 1999. 56p. (Embrapa Meio Ambiente Documento14).
- SARTO, F.; FINNOTO, S.; GIACOMELLI, L.; MAZZOTTI, D.; TOMANIN, R.; LEVIS, A. G. 1987. The micronucleus assay in exfoliated cells of the human buccal mucosa. *Mutagenesis.* 2(1): 11-17.
- STOPPELLI, I. M. B. S. 2005. Saúde e segurança alimentar: a questão dos agrotóxicos. *Ciência e saúde coletiva.* 10(2): 5-12.
- TOLBERT, P. E.; SHY, C. M.; ALLEN, J. W. 1991. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: A field test in snuff users. *American Journal of Epidemiology.* 134(8): 840-850.
- TOLBERT, P. E.; SHY, C. M.; ALLEN, J. W. 1992. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutat. Res.* 271(1): 69 -77.