

INSTABILIDADE CROMOSSÔMICA, CITOTOXIDADE E PARÂMETROS DE MORTE CELULAR EM TRABALHADORES RURAIS DE BARRETOS, SP ATRAVÉS DO ENSAIO DE MICRONÚCLEOS

Jefferson Tennesse da Silva Vicente
(Bolsista CAPES – UNIC - MT)
enf.jefftenesse@gmail.com

Henrique César Santejo Silveira
(Orientador – UNIC – MT)
henriquecssilveira@gmail.com

Introdução

A exposição ocupacional de trabalhadores rurais aos agrotóxicos vem sendo constantemente remontada, sendo comprovado os efeitos deletérios a saúde humana. (SANTANA; MOURA; NOGUEIRA, 2013).

A atividade ocupacional no campo expõe o trabalhador a desencadear danos genotóxicos, que podem levar a carcinogênese. Dessa forma um importante biomarcador para avaliação e indicação de possíveis danos cromossômicos em populações expostas a mutagênicos são os Micronúcleos (MN) (HOLLAND *et al.*, 2008).

De acordo com levantamento realizado pelo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), em 2018-2019 serão registrados no país 600 mil novos casos de câncer.

Ainda de acordo com INCA os tipos mais frequentes de câncer associados a exposição ocupacional, são os de pulmão, os mesoteliomas, o câncer de pele, o de bexiga e as leucemias.

Sendo assim o objetivo deste estudo é avaliar os micronúcleos nas células da mucosa bucal no grupo de trabalhadores rurais e compará-los a um grupo controle (sem exposição aos agrotóxicos).

Material e Métodos

Local e População de estudo

Estudo transversal descritivo. Trata-se de um projeto executado na região de Barretos para coleta de informações e material biológico dos participantes. A análise de biomarcador foi realizada no Hospital de Câncer de Barretos – HCB, no Instituto de Ensino e Pesquisa, localizado na cidade de Barretos – SP. Foram incluídos 80 trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos, 80 indivíduos sem histórico de exposição.

Coleta das células e preparação das lâminas

As células bucais esfoliadas foram coletadas de ambos os grupos utilizando cytobrush (BD TriPath Imaging, Burlington, N.C., EUA). O conservante líquido a base de álcool, SurePath (BD TriPath Imaging), foi utilizado para preservar as amostras coletadas. O material foi transferido para um tubo falcon e centrifugado a 1.500 rpm por 10 min. As células sedimentadas foram ressuspensas em Buccal Cell Buffer e transferidas para uma câmara de deposição montada em lâminas limpas e identificadas. As células foram fixadas por meio de lâminas tratadas com carga positiva com Poly-L-Lisina, peletizados por gravidade e foram subsequentemente corados.

Coloração citológica, critérios de avaliação e análise estatística

As lâminas foram coradas com reagente de Schiff's (Merck, Darmstadt, Alemanha) e contracorada com 0,5% de fast. O experimento foi realizado em duplicata, com 160 lâminas preparadas, totalizando 320 lâminas. Depois da secagem, todas as lâminas foram recobertas por lamínulas e analisadas sob microscopia de luz de 100x. A análise foi realizada em omissão (teste cego), para garantir integridade da avaliação. Para cada sujeito da pesquisa foram avaliadas 1.000 células para a caracterização dos micronúcleos afim de estimar instabilidade cromossômica, células binucleadas, ponte nucleoplasmática, *nuclear buds*, cariorrexe, cariólise, picnose e cromatina condensada, morfologias estas associadas com citotoxicidade e morte celular.

O protocolo para avaliação de micronúcleos em células bucais foi baseado no estudo de Ramos e colaboradores (2014).

Foram utilizados os critérios estabelecidos por Thomas *et al.*, (2009), Bolognesi *et al.*, (2013) para se determinar a frequência de micronúcleos e demais anormalidades nucleares.

Os dados da contagem das anomalias nucleares de ambos os grupos foram exportados da plataforma *REDCap* através de um banco de dados criado no software SPSS (*Statistical Package for the Social Science*, versão 20.0) e após a verificação da consistência dos dados.

Inicialmente, os dados foram tabulados considerando as estatísticas descritivas (média, desvio padrão, mínimo, máximo e quartis) para os dados quantitativos; e tabelas de frequência para os qualitativos.

Os grupos foram estratificados e avaliados quanto a distribuição das variáveis e apresentaram distribuição anormal (não-paramétrico). O teste de exato de *Mann-Whitney* foi utilizado para a comparar as diferenças de morfologia celulares nos grupos.

Aspectos éticos

Todos os critérios éticos necessários, foram utilizados e respeitados inclusive, sua apreciação ao Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos, recebendo parecer favorável com o número CEP: 1108/2016.

Resultados e Discussão

A análise baseou-se no levantamento de 160 indivíduos, com média de idade de 49 anos nos expostos e 47 anos nos não expostos. Quanto as características gerais, o sexo masculino predomina-se tanto nos não expostos (82,5%) como nos expostos (83,8%).

Através do ensaio de micronúcleos, foram avaliados várias morfologias, dentre elas células binucleadas, *broken eggs*, *nuclear buds*, cariorrexe, cariólise, picnose e cromatina condensada. Foi encontrado diferença estatisticamente significativa na presença de micronúcleos ($p=0,001$) no grupo exposto a agrotóxicos, assim como para células binucleadas ($p=0,039$), cromatina condensada ($p=0,006$) e cariorrexe ($p=0,002$), conforme demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1. Frequências de MN e outras anomalias nucleares no grupo exposto e não exposto

Grupo	MN	Binucleada	<i>Broken Eggs</i>	<i>Nuclear buds</i>	Cariorrexe	Cariólise	Picnose	Cromatina Condensada
Exposto	2±2	2±2	1±4	2±3	5±6	4±6	4±5	4±6
Não-exposto	1±1	1±1	1±1	1±2	2±4	3±4	5±5	2±3
P	0,001*	0,039*	0,427	0,128	0,002*	0,073	0,539	0,006

Valores expressos através da média ± desvio padrão, em 1000 células (%).

Valor significativo (Considerado p-valor < que 0,05)

Teste Exato de *Mann-Whitney*

Fonte: Dados da pesquisa

No presente estudo a frequência de micronúcleos foi maior no grupo de trabalhadores rurais quando comparado com os não expostos. Coincidentemente, no estudo de Carbajal López *et al.*, (2016) avaliou-se o efeito genotóxico dos agrotóxicos em aplicadores de pesticidas utilizando o ensaio de micronúcleos em células epiteliais da mucosa bucal e os autores demonstraram o aumento deste biomarcador no grupo exposto.

Em um estudo recente de Marcelino, Wachtel e Ghisi (2019), os autores compararam os trabalhadores rurais que foram expostos a pesticidas em sua atividade laboral a pessoas que não tiveram contato com essas substâncias tóxicas, a análise estatística revelou uma diferença estatisticamente significativa entre as frequências de micronúcleos da mucosa bucal. Nos achados de Benedetti *et al.* (2018) e Gaikwad *et al.*,(2018) também foram encontrados aumento da frequência de micronúcleos em trabalhadores expostos aos agrotóxicos nas plantações de soja e uva respectivamente. Estes resultados corroboram com os nossos achados.

O estudo possui algumas limitações, não foi possível dosagem biológica em soro ou urina dos princípios ativos mais relatados pelos trabalhadores rurais, a realização de exames hematológicos e ou marcadores bioquímicos. Além disso, não foi possível no questionário averiguar os aspectos nutricionais de cada grupo.

Conclusão

Através da aplicação do questionário encontramos as principais características demográficas, o histórico ocupacional dos trabalhadores rurais. Quando comparamos os

biomarcadores em ambos os grupos, encontramos no grupo exposto maior predominância de micronúcleos, células binucleadas, apoptóticas e necróticas. Nossos resultados sugerem que a utilização dos agrotóxicos está associada a possíveis eventos genotóxicos que podem ser vinculados ao potencial risco de câncer.

Agradecimentos

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), através do PROSUP/Bolsas - Código de Financiamento 001, pela concessão da bolsa, ao Dr. Henrique César Santejo Silveira pela orientação e sabedoria, aos docentes da pós-graduação e demais colegas.

Referências

BENEDETTI *et al.* DNA damage and epigenetic alteration in soybean farmers exposed to complex mixture of pesticides. **Mutagenesis**, v. 33, n. 1, 2018.

BOLOGNESI *et al.* The HUMNxl scoring criteria for different cell types and nuclear anomalies in the buccal micronucleus cytome assay – An update and expanded photogallery. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 753, n. 2, 2013.

CARBAJAL-LÓPEZ Y *et al.* Biomonitoring of agricultural workers exposed to pesticide mixtures in Guerrero state, Mexico, with comet assay and micronucleus test. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 3, 2016.

GAIKWAD *et al.* Assessment of hematological, biochemical effects and genotoxicity among pesticide sprayers in grape garden. **Journal of Occupational Medicine and Toxicology**, v. 10, n. 1, 2015.

HOLLAND *et al.* The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. **Mutat Res**, v. 659, n. 12, 2008.

INCA. Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva, organizador. **Diretrizes para a vigilância do câncer relacionado ao trabalho**. Rio de Janeiro: INCA; 2012. 187 p

INCA. Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva, organizador. **Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2017. 130 p.

MARCELINO A.; WACHTEL C.; GHISI N. Are Our Farm Workers in Danger? Genetic Damage in Farmers Exposed to Pesticides. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 16, n. 3, 2019.

RAMOS *et al.* Micronucleus Evaluation of Exfoliated Buccal Epithelial Cells Using Liquid-Based Cytology Preparation. **Acta Cytologica**, v. 58, n. 6, 2014.

SANTANA, V.S.; MOURA, M.C.P.; NOGUEIRA, F.F. Mortalidade por Intoxicação ocupacional relacionada a agrotóxicos, 2000-2009, Brasil. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v. 47, n. 3, 2013.

THOMAS *et al.* Buccal micronucleus cytome assay. **Nature Protocols**, v. 4, n. 6, 2009.