

Teste de micronúcleos como ferramenta para avaliação da exposição ocupacional a pesticidas: revisão

Erica Ballestreri

Graduada em Biomedicina pela Universidade Feevale (2012) com habilitação em Patologia Clínica, Mestre (bolsista CAPES) em Biologia Celular e Molecular (2015) e atualmente é Doutoranda na mesma área. E-mail: ericaballestreri@yahoo.com.br

Registro DOI: <http://dx.doi.org/10.22280/revintervol10ed1.260>

Resumo

Apesar dos efeitos benéficos relacionados ao uso de pesticidas como no controle de pragas e vetores importantes na saúde pública, muitos desses produtos podem apresentar perigos potenciais para o meio ambiente e a saúde humana. Os pesticidas são considerados compostos genotóxicos capazes de induzir dano direto e indireto no DNA. Para avaliar o dano genético, estudos de biomonitoramento têm sido cada vez mais aplicados, pois além de identificar o risco potencial de surgimento de doenças em populações expostas, também auxilia na identificação de fatores de risco e medidas adequadas para serem implementadas no controle dessas agressões a saúde humana. O teste do micronúcleo oferece vantagens em relação aos demais testes de biomonitoramento incluindo baixo custo, procedimento técnico mais fácil, rapidez de análise para triagem de grande número de substâncias, além de diversos tipos celulares como linfócitos de sangue periférico, células epiteliais da mucosa oral, mucosa vaginal, entre outros poderem ser utilizados para a realização do teste. É considerado padrão ouro para avaliação citogenética de lesões que ocorrem no DNA, pois serve como indicador de mutagenicidade e como instrumento de monitoração, considerando que a frequência de MN retorna aos níveis basais quando o organismo permanece durante certo período sem contato com esses agentes indutores. Sendo assim, o objetivo dessa revisão é demonstrar a importância do teste de micronúcleos como ferramenta para avaliação da exposição ocupacional aos pesticidas.

Palavras-chave: Biomonitorização. Genotoxicidade. Pesticidas. Micronúcleos.

Micronucleus assay as a tool for evaluation of occupational exposure to pesticides: a review

Abstract

Despite the beneficial effects related to the use of pesticides as in the control of important pests and vectors in public health, many of these products may present potential hazards to the environment and human health. Pesticides are considered genotoxic compounds capable of inducing direct and indirect DNA damage. To evaluate the genetic damage, biomonitoring studies have been increasingly applied because beyond to identify the potential risk of emergence of disease in exposed populations, also helps to identify risk factors and appropriate measures to be implemented in the control of these aggression on human health. The micronucleus (MN) assay offers advantages in relation to other biomonitoring tests including low cost, easier technical procedure, analysis speed for screening large number of substances, and various cell types such as peripheral blood lymphocytes, epithelial cells of the oral mucosa, vaginal mucosa, among others may be used for this assay. It is considered the gold standard for cytogenetic evaluation of lesions occurring in DNA, it serves as mutagenicity index and as a monitoring tool, whereas the MN frequency returns to baseline levels when the organism remains for some time without contact with these inducing agents. Thus, the objective of this review is to demonstrate the importance of the MN assay as a tool for evaluation of occupational exposure to pesticides.

Keywords: Biomonitoring. Genotoxicity. Pesticides. Micronucleus.

Recebido em 30/05/2016 Aceito em 22/11/2016

1 Introdução

Com o aumento da industrialização, os trabalhadores estão frequentemente expostos a agentes químicos, físicos e biológicos, que podem ter um efeito mutagênico e carcinogênico dependendo do grau, tempo e substância o qual estão expostos (CORREA et al., 2009).

Há uma forte relação entre a exposição a agentes genotóxicos e o desenvolvimento de diversos efeitos nocivos à saúde, principalmente com a incidência de cânceres e

problemas reprodutivos (FLORES; YAMAGUCHI, 2008). Atualmente, um grande número desses agentes, responsáveis por alterações no material genético, têm sido identificados e descritos na literatura. Entre eles estão ondas eletromagnéticas, fármacos, substâncias que afetam o sistema nervoso central, antibióticos, conservantes alimentares, alguns vírus e protozoários e em grande escala os pesticidas. Essa exposição pode aumentar a ocorrência de mutações no material genético, nesse sentido, as exposições ocupacionais podem atuar como agentes silenciosos na indução de danos no DNA (KOHATSU et al., 2007; DUSMAN et al., 2012).

Apesar dos efeitos benéficos relacionados ao uso de pesticidas como no controle de pragas e vetores importantes na saúde pública, muitos desses produtos podem apresentar perigos potenciais para o meio ambiente e a saúde humana, porém nem sempre as consequências são imediatas, podendo demorar anos para se manifestar. Diante disso, estudos de monitoramento se tornam importantes para avaliar as enfermidades agudas e crônicas ocasionadas pela exposição aos pesticidas (LOBO; BOLAÑOS, 2014).

A monitorização biológica apresenta vantagens quando comparada à monitorização ambiental, já que considera todas as vias de entrada possíveis no organismo, permite ainda identificar e até certo ponto quantificar, o risco de exposição a fatores ambientais e tem sido por isto, uma ferramenta de grande interesse na avaliação da exposição à carcinogêneos (COSTA; TEIXEIRA, 2012).

O estudo de biomarcadores de exposição inclui a detecção direta, ao microscópio, de danos no DNA. Diversos testes citogenéticos podem ser aplicados para esse fim, como trocas entre cromátides irmãs, teste do cometa, teste do micronúcleo (MN) e o teste de aberrações cromossômicas (KOHATSU et al., 2007).

O teste do MN oferece vantagens em relação aos demais testes de biomonitoramento incluindo baixo custo, procedimento técnico mais fácil, rapidez de análise para triagem de grande número de substâncias e, além disso, é possível avaliar as diferentes fases da farmacocinética das drogas e avaliar danos cromossômicos possuindo reprodutibilidade satisfatória, já que foi adaptado por vários autores ao estudo de diferentes espécies (FLORES; YAMAGUCHI, 2008).

Sendo assim, o objetivo dessa revisão é demonstrar a importância do teste de micronúcleos como ferramenta para avaliação da exposição ocupacional aos pesticidas.

2 Pesticidas

Os pesticidas são classificados como um grupo heterogêneo de produtos químicos amplamente utilizados pelo homem, tanto para proteger a produção agrícola de organismos nocivos e garantir a qualidade das colheitas como para controlar vetores e pragas importantes na saúde pública (LOBO; BOLAÑOS, 2014). Em todo o mundo eles têm sido utilizados extensivamente desde 1940 na proteção de plantações e em ações sanitárias que visam eliminar vetores que transmitem malária, febre tifoide, ectoparasitas humanos, etc. Seu uso aumenta a cada ano e o Brasil é um dos maiores consumidores destes produtos (RAMOS, 2009; SILVA, 2013).

A Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) define os pesticidas como substâncias ou misturas destinadas a prevenir, destruir, ou controlar qualquer praga, incluindo insetos, roedores e ervas daninhas. Eles abrangem os inseticidas, herbicidas, fungicidas, desinfetantes e reguladores de crescimento (SILVA, 2013; LOBO; BOLAÑOS, 2014).

A sua absorção depende das propriedades físico-químicas, da dose, duração e via de exposição. Entre os principais fatores causadores da elevação da absorção dos pesticidas estão inadequada proteção individual, uso repetido da mesma roupa contaminada durante dias, técnicas inadequadas de aplicação, lavagem de equipamentos em tanque doméstico (RAMOS, 2009).

A pele, o trato respiratório e trato gastrointestinal constituem as principais vias de exposição e absorção. A inexistência de processos enzimáticos capazes de transformar os anéis aromáticos e remover os átomos de cloro desses agentes faz com que sua metabolização seja extremamente lenta. Além disso, eles apresentam propriedades lipofílicas, acumulando-se no tecido adiposo permanecendo estáveis até que pequenas quantidades sejam excretadas e as concentrações no sangue sejam compensadas (COSTA; TEIXEIRA, 2012).

Apesar da importância dos pesticidas na agricultura, eles são considerados compostos genotóxicos capazes de induzir dano direto (danificando diretamente as bases) e indireto no DNA (através da produção de radicais livres), danos esses que podem ser reparados, ou não, causando, assim, uma mutação no organismo. Um dos grupos mais afetados de pessoas são os que trabalham diretamente com a aplicação do pesticida, mas, também os consumidores constituem um grupo de risco (COSTA; TEIXEIRA, 2012; SILVA, 2013).

As intoxicações agudas são um dos efeitos mais conhecidos dos pesticidas, porém nem sempre as consequências dessa exposição estão relacionadas com lesões imediatas e aparentes, outros efeitos na saúde humana também estão relacionados a essa exposição, tais como doenças dermatológicas, neurológicas, reprodutivas, dano genético e uma elevada incidência no aumento do câncer, incluindo o câncer de pele, próstata, mama, ovário, estômago, dentre outros (LOBO; BOLAÑOS, 2014). No estudo de Olaya-Contreras et al., (2002) com 153 casos incidentes de câncer de mama, foi verificada uma associação entre o risco de desenvolvimento desse câncer e os níveis séricos do pesticida dicloro-difenil-tricloroetano (DDT).

O dano genético, em estudos de biomonitoramento, tem sido detectado com maior frequência quando os níveis de exposição a esses pesticidas são altos, uso intenso, mau uso ou falta de medidas de proteção e controle. Esses estudos têm sido cada vez mais aplicados, pois além de identificar o risco potencial de surgimento de doenças em populações expostas, também auxilia na identificação de fatores de risco e medidas adequadas para serem implementadas no controle dessas agressões a saúde humana (RAMOS, 2009).

3 Teste de Micronúcleos

Uma maneira de se estudar os efeitos de xenobióticos em uma população exposta é conduzir estudos de monitoramento, a fim de determinar se essa exposição pode ou não causar um dano à saúde, para isso utiliza-se parâmetros biológicos pertinentes, com manifestação a curto prazo, tais como ensaios de micronúcleos, que podem identificar danos no DNA e/ou nos cromossomos, resultantes da exposição ocupacional (CORREA et al., 2009).

Muitas podem ser as alterações observadas no organismo dos indivíduos quem têm contato com estes agentes sabidamente carcinogênicos. Tais alterações podem ser visualizadas nos linfócitos de sangue periférico, identificados como MN ao redor do núcleo principal da célula (dos SANTOS; NARDIN, 2014).

Os linfócitos são células da família dos leucócitos, constituem 25-35% do total das células brancas e são divididos em dois subtipos principais, B e T. A principal função destas células é defender o organismo contra invasores, principalmente virais e células neoplásicas. Por possuírem um tempo de vida relativamente longo, em comparação as outras células do organismo, tal célula é ideal para estudos de genotoxicidade. Porém, além de linfócitos de sangue periférico outros tipos celulares podem ser utilizados para o teste do MN tais como células epiteliais da mucosa oral, mucosa vaginal, entre outros (KOHATSU et al., 2007; dos SANTOS; NARDIN, 2014).

A análise de células epiteliais está cada vez mais sendo utilizada por se tratar de um método não invasivo que permite coletas sucessivas, além do estudo direto das células da camada basal que sofreram mutação, em média, até 20 dias após a exposição (KOHATSU et al., 2007).

O teste do MN foi descrito pela primeira vez por Schimidt em 1975 e a única exigência era a escolha de tipos de células com elevada atividade mitótica. Em 1985, o teste foi aprimorado e foi desenvolvida a técnica de bloqueio de citocinese¹, utilizando um agente químico chamado citocalasina B, que leva a inibição da citocinese, mas não impede a divisão nuclear, levando a um acúmulo de células binucleadas a partir de células que passaram por apenas um ciclo de divisão nuclear. A análise em células binucleadas permite uma medida mais precisa da frequência de células com MN, pois seria necessário avaliar o dobro de células mononucleadas para observar o mesmo nível de danos nas binucleadas. Essa técnica foi validada em todo o mundo em 1999 (FLORES; YAMAGUCHI, 2008; CHEQUER, 2008).

A formação do MN é resultado da perda de cromossomos inteiros ou apenas fragmentos de cromossomos que não migraram para o núcleo principal após a divisão mitótica, estes fragmentos não são incluídos nos núcleos das células filhas originando assim a formação de um micronúcleo, sendo este morfologicamente igual ao núcleo

¹ Processo de divisão do citoplasma no final da divisão celular.
Revinter, v. 10, n. 01, p. 19-28, fev. 2017.

principal (Figura 1), porém de tamanho inferior, assim esse teste detecta mutagênese cromossômica, como clastogênese e aneugênese (da ROSA. 2009; ANCINES, 2011; COSTA; TEIXEIRA, 2012).

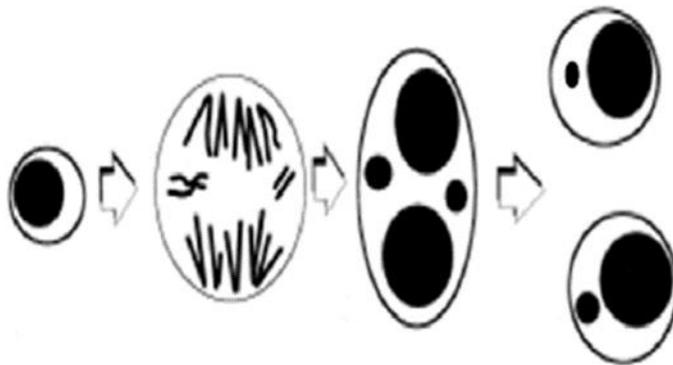


Figura 1: Expressão do micronúcleo em uma célula em divisão (CHEQUER, 2008).

O protocolo básico do teste é o isolamento de linfócitos, a contagem de células, o bloqueio da divisão celular, fixação das células com uma solução de metanol: ácido acético glacial e coloração com Giemsa para a observação em microscópio. Especificamente, os MN observados em células de tecidos epiteliais esfoliadas são formados nas células da camada basal; a amostra é colhida por muco raspagem e transferidas para lâminas onde serão fixadas em 80% de etanol, coradas com corantes específicos e analisadas entre 500 a 4000 células (LOBO; BOLAÑOS, 2014).

O uso de técnicas de hibridização fluorescente *in situ* tem permitido encontrar a origem dos micronúcleos, promovendo a determinação, com mais eficácia, do efeito clastogênico e aneugênico desses agentes genotóxicos (FARIA; BRAGA, 2015).

Esse teste é considerado padrão ouro para avaliação citogenética de lesões que ocorrem no DNA (FARIA; BRAGA, 2015). O Estudo de Bortoli et al., (2009) demonstrou aumento significativo de células com micronúcleos em trabalhadores expostos a pesticidas nos campos de soja. Bolognesi et al., (2002) observaram diferenças significativas na frequência de MN ao nível de dano genético entre populações expostas a pesticidas e populações controle; e o estudo realizado por Garaj-Vrhovac e Zeljezic (2002) mostrou que, após um período de oito meses sem a exposição aos

produtos, a frequência de MN e aberrações cromossômicas sofreu um decréscimo em relação aos grupos recentemente expostos.

Assim, esses estudos comprovam a eficácia do teste, demonstrando a possibilidade de danos genômicos nos trabalhadores expostos e sua aplicabilidade no monitoramento desses indivíduos, sendo um indicativo para a mudança de hábitos para aqueles que ainda não apresentaram sinais evidentes de danos ou de alterações celulares e também permitindo auxiliar na elucidação dos mecanismos carcinogênicos envolvidos (FLORES; YAMAGUCHI, 2008; CORREA et al., 2009; FARIA; BRAGA, 2015).

4 Considerações Finais

A ampla utilização dos pesticidas, o conhecimento mínimo dos riscos associados à sua utilização crônica, o desrespeito as normas de segurança e controle, os problemas sociais encontrados no meio rural constituem as principais causas que levam ao agravamento dos quadros de doenças e definem o uso desses produtos como um dos maiores e mais graves problemas de saúde pública no meio rural. Diante disso, o estudo da ação genotóxica dos pesticidas representa uma contribuição para uma adequada avaliação clínica e epidemiológica do potencial risco para a saúde associados à sua exposição e o teste de MN, se destaca dos demais ensaios de genotoxicidade por permitir de forma rápida e confiável a detecção de alterações no material genético em populações expostas a esses produtos, podendo ser utilizado como indicador de mutagenicidade e como instrumento de monitoração, considerando que a frequência de MN retorna aos níveis basais quando o organismo permanece durante certo período sem contato com esses agentes indutores.

REFERÊNCIAS

ANCINES, C. **Biomonitoramento em trabalhadores do setor coureiro-calçadista do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2011.

BOLOGNESI, C.; PERRONE, E.; LANDINI, E. Micronucleus monitoring of a floriculturist population from western Liguria, Italy. **Mutagenesis**, n. 17, p. 391-397, 2002.

BORTOLI, G.M.; AZEVEDO, A.B.; SILVA, L.B. Cytogenetic biomonitoring of Brazilian workers exposed to pesticides: micronucleus analysis in buccal epithelial cells of soybean growers. **Mutation Research**, p. 1-4, 2009.

CHEQUER, F.M.D. **Utilização do teste de micronúcleo na avaliação da toxicidade dos corantes Disperse Red 1, Disperse Orange 1 e Disperse Orange 13**. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, 2008.

CORREA, N.S.; BASSAN, J.S.; CUNHA, C.J.D.; FERNANDEZ, R.R.; BACHETTINI, P.S.; GARCIAS, G.D.L.; ROTH, M.G.M. Monitoramento da ação genotóxica em trabalhadores de sapatarias através do teste de micronúcleos, Pelotas, Rio Grande do Sul. **Ciência e Saúde Coletiva**, n. 14, p. 2252-60, 2009.

COSTA, C.; TEIXEIRA, J.P. Efeitos genotóxicos dos pesticidas. **Revista de Ciências Agrárias**, n. 2, p. 19-31, 2012.

Da ROSA, L.A.Z.C. **Avaliação de fator de risco ocupacional no setor de fabricação de tintas em uma fábrica localizada na região Sul de Santa Catarina**. Criciúma: Universidade do Extremo Sul Catarinense, 2009.

Dos SANTOS, T.M.; NARDIN, J.M. Estudo piloto da ocorrência de micronúcleos em linfócitos de profissionais de saúde atuantes em oncologia. **Cadernos da Escola de Saúde**, p. 128-42, 2014.

DUSMAN, E.; BERTI, A. P.; SOARES, L.C.; VICENTINI, V.E.P. Principais agentes mutagênicos e carcinogênicos de exposição humana. **Revista Saúde e Biologia**, n. 2, p. 66-81, 2012.

FARIA, L.E.M.; BRAGA, J.R.M. Aplicação do teste de micronúcleo para avaliação de potencial genotóxico em epitélio oral de estudantes universitários. **Revista Eletrônica Atualiza Saúde**, n. 1., p. 36-41, 2015.

FLORES, M.; YAMAGUCHI, M.U. Teste do micronúcleo: uma triagem para avaliação genotóxica. **Revista Saúde e Pesquisa**, n. 3, p. 337-40, 2008.

GARAJ-VRHOVAC, V.; ZELJEZIC, D. Assessment of genome damage in a population of Croatian workers employed in pesticide production by chromosomal aberration analysis, micronucleus assay and comet assay. **Journal of Applied Toxicology**, p. 255. 2002.

KOHATSU, A.G.D.S.; SHIMABUKURO, F, GATTÁS, G,J,F. Utilização dos testes de mutagenicidade para a avaliação da exposição ocupacional. **Saúde, Ética e Justiça**, n. 12, p. 15-21, 2007.

LOBO, T.M.; BOLAÑOS, A. Micronúcleos: biomarcador de genotoxicidad em expostos a plaguicidas. **Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud**, n. 2, p. 18-26, 2014.

OLAYA-CONTRERAS, P.; RODRIGUEZVILLAMIL, J.; POSSO-VALENCIS, H.J.; CORTEZ, J.E. Organochlorine exposure and breast cancer risk in Colombian women. **Cadernos de Saúde Pública**, n. 3, p. 125-132, 1998.

RAMOS, E.M.S.P. **Biomonitoramento genético de indivíduos expostos ocupacionalmente a pesticidas no povoado Vila Bessa, município de Conceição do Jacuípe, Bahia**. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 2009.

SILVA, U.G.A. **Avaliação genotóxica dos pesticidas metomil e cipermetrina: efeitos agudos in vivo**. Vitória de Santo Antão: Universidade Federal de Pernambuco, 2013.