



ARTIGO | ARTICLE

Análise citogenética em trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos

Cytogenetic analysis investigation in farmers exposed to pesticides

Anderson do Espírito Santo Pereira¹
Nathalia Zocal Pereira dos Santos¹
Leonardo Fernandes Fraceto²
Renata de Lima¹

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos genotóxicos da exposição aos agrotóxicos em trabalhadores rurais, usando dois testes para avaliação, o colinesterásico e o citogenético, uma vez que se observa que não são obedecidas às indicações de segurança, o que conseqüentemente, leva a danos a saúde como os efeitos neurotóxicos, o câncer e até mesmo a morte. Foram estudados trabalhadores rurais residentes no município de São Miguel Arcanjo (SP), local que possui sua economia voltada à agricultura. Como métodos foram realizados testes citogenéticos e medida dos níveis de colinesterase. Estes níveis são constantemente dosados nos indivíduos que trabalham na agricultura, porém acredita-se que estes não refletem possíveis alterações no material genético. Os resultados mostraram um grande número de indivíduos com alterações genéticas (de 36 indivíduos analisados, 21 apresentaram algum tipo de alteração), o que leva a uma reflexão com relação ao uso indevido dos produtos tóxicos, assim como, a não utilização de equipamento de proteção individual. Estas informações sugerem a existência de uma questão social e educacional envolvida com este assunto e a necessidade de mais atenção à saúde do trabalhador em regiões rurais.

Palavras-chave: Análise citogenética. Aberrações cromossômicas. Exposição a praguicidas. Inibidores da colinesterase.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the genotoxic effect in agricultural workers that are exposed to pesticides, using two different tests for evaluation; the cholinesterase

¹ Universidade de Sorocaba, Departamento de Biotecnologia. Rod. Raposo Tavares, km 92,5, 18023-000, Sorocaba, SP, Brasil. Correspondência para/Correspondence to: R. LIMA. E-mail: <renata.lima@prof.uniso.br>.

² Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Departamento de Engenharia Ambiental. Sorocaba, SP, Brasil.

and the cytogenetic. At a time that we observed that indications of safety are not obeyed, what consequently, cause damages to their health as a neurotoxic effect, cancer and even death. The studied was conducted in agricultural workers residing in the city of São Miguel Arcanjo (SP) that has a major part of its economy directed to agriculture. The method was carried through cytogenetic tests and measures in the levels of cholinesterase. These levels were constantly dosed in the individuals working in agriculture; believing that these do not reflect possible alterations in the genetic material. The results had shown a great number of individuals with genetic alterations (of 36 individuals analyzed, 21 had presented some type of alteration), what has lead us to a reflection in regards to the improper use of the pesticides, as well as, not using proper personal protection equipment. This information has lead us to believe that the problem with this subject involved a social and educational matter and that perhaps we should pay more attention to the health of agricultural workers in the region.

Key words: Cytogenetic analysis. Chromosome aberrations. Pesticide exposure. Cholinesterase inhibitors.

INTRODUÇÃO

No último século aconteceram grandes mudanças com relação aos processos tecnológicos na agricultura, o que levou a uma modificação da maneira de produzir, renovando a maneira de pensar e agir. A agricultura que por gerações foi a forma de vida dos agricultores e de suas famílias, torna-se uma atividade comercial (Organização Internacional do Trabalho, 2005).

Para ter um rendimento maior nestes processos e ter o controle de fatores indesejáveis, o agricultor faz uso indiscriminado de diversos produtos químicos, que embora sejam eficientes, são agentes poluidores e podem causar danos ao ambiente (Nunes & Tajara, 1998). No Brasil a pesquisa dos efeitos que estes produtos podem causar a saúde tem aumentado nos últimos anos, porém ainda é insuficiente. A informação ainda é falha, tanto com relação ao uso, como com relação às consequências devido ao mau uso do produto (Faria et al., 2007).

Uma das consequências da má utilização dos agrotóxicos é o câncer, uma doença caracterizada pelo acúmulo de falhas no material genético e erros cromossômicos, cuja causa, na maioria das vezes, esta relacionada com a exposição a agentes genotóxicos, os quais podem provocar uma instabilidade cromossômica como ganho ou perda de cromossomos, deleções e/ou translocações que induzem à carcinogênese (Klein, 1981; Rowley, 1984; Cavane et al., 1983; Vogelstein & Kinzler et al.,

1998). Estudos que visam à saúde do trabalhador mostram que em diversos países os indivíduos que estão em contato constante com diferentes tipos de praguicidas apresentam alterações (aberrações) cromossômicas, estando estas relacionadas à utilização de agrotóxicos, bem como a qualidade de vida destes indivíduos (Bréga et al., 1998; Shabtai et al., 1979; Reynolds et al., 2002).

Na tentativa de mensurar e controlar a exposição dos trabalhadores aos agentes toxicológicos conhecidos é classicamente investigado o nível da enzima colinesterase nestes indivíduos. Esta enzima tem como função a hidrólise da acetilcolina, a qual é responsável pela transmissão de impulso nervoso nas fibras pré-ganglionares e pré-ganglionares parassimpáticas (FUNASA, 2001). Agrotóxicos do tipo organofosforados (OP) e carbamatos têm a característica de quando absorvidos pela pele ou ingeridos apresentarem como consequência a inibição de enzimas colinesterases (Organização Pan-Americana de Saúde/ Organização Mundial Saúde, 1996). Os inibidores de AChE (acetilcolinesterase) atuam como pseudo-substrato ligando-se ao aminoácido serina do sitio ativo da enzima, causando um aumento da inibição, ocorrendo assim um acúmulo de acetilcolina nas sinapses, levando o indivíduo à morte e a falência respiratória (Timothy et al., 2009). Muitos trabalhadores rurais, preocupados com os níveis de intoxicação por estes produtos, periodicamente avaliam o nível de exposição dos pesticidas através de dosagem de

enzimas (Organization for Economic Co-Operation and Development, 1997; Faria et al., 2004).

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da exposição aos agrotóxicos em 36 trabalhadores rurais do município de São Miguel Arcanjo, para isto foram realizados dois tipos de procedimentos, a análise citogenética e a dosagem de colinesterase.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

As amostras de sangue periférico foram coletadas de 46 indivíduos divididos em 2 grupos, um grupo controle negativo (10 indivíduos) e um grupo de exposição a pesticidas (36 indivíduos), todos os participantes são moradores do município de São Miguel Arcanjo, sendo o critério de inclusão o trabalho na lavoura e a ausência de doença crônica como doenças autoimunes, câncer, infecções. Sendo o estudo realizado mediante assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido e aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade de Sorocaba (protocolo CEP-UNISO nº 022/08). O material coletado foi dividido em duas alíquotas, uma para realização dos ensaios de colinesterase e outra para realização das análises citogenéticas.

As análises de citogenética foram realizadas através de cultura de linfócitos, na qual 500µL de sangue periférico que foram incubados em 5mL de meio de cultura RPMI (Cultilab®) suplementado com 20% de soro fetal bovino e 2% de fitohemaglutinina, tudo mantido a 37°C em incubadora com umidade controlada e com 5% de CO₂ durante 72 horas (Moorhead et al., 1960). Aproximadamente 40 minutos antes do final do período de incubação foram adicionados 15µL de colchicina em cada cultura, no fim do período de 72h de incubação foi realizada a hipotonia celular com solução de KCl 0,075M a 37°C, por 1 hora. Após hipotonia o material foi fixado em metanol/ácido acético (3:1, v/v) e corado com o corante Giemsa, as lâminas foram analisadas por microscopia.

Para a quantificação da colinesterase foi utilizando o protocolo comercial para dosagem de colinesterase (Winner), seguindo os procedimentos do fabricante contidos neste (Knedel et al., 1967).

RESULTADOS

Dos 46 indivíduos analisados 82,6% são do sexo masculino e 17,4% feminino, 36 indivíduos trabalham diretamente com a agricultura e moram na zona rural, enquanto o restante do grupo (10 indivíduos) habita zona urbana não tendo contato com pesticidas (grupo-controle). Fatores como agentes químicos externos foram levantados (Figura 1), assim como a utilização de Equipamento de Proteção Individual (EPI), que mostrou que 80,5% trabalham sem utilizar os acessórios adequados para se evitar o contato com estes produtos.

Em média são utilizados 61 produtos diferentes para pulverização, que possuem 54 ingredientes ativos diferentes, pertencentes a 37 grupos químicos, sendo os organofosforados utilizados por 94,4% dos indivíduos, os Alquilenobis (ditocarbamato) por 91,0% e os Dicarboximida por 86,0%. A utilização conjunta de Carbamato Alquilenobis foi observada em 8,3% dos casos.

A classificação toxicológica foi determinada tomando como base os bancos de dados fornecidos pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) pelo sistema AGROFIT (portaria nº 220), como resultado do levantamento realizado foi verificado que 7 dos produtos utilizados pelos voluntários deste estudo são classificados como extremamente tóxicos, 14 como altamente tóxicos, 24 como mediamente tóxicos e 14 como pouco tóxicos e 2 produtos não apresentam classificação. Observa-se que a utilização simultânea de vários produtos é prática comum entre os agricultores.

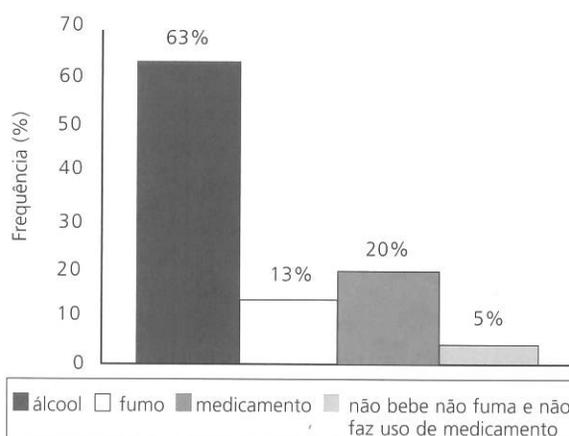


Figura 1. Distribuição dos fatores externos a que os indivíduos estudados são expostos.

No Brasil grande parte do estudo sobre contaminação com agrotóxicos aborda questões ocupacionais, acidentais ou suicidas, não existindo muitos relatos com relação aos efeitos da exposição contínua, assim como, estudos que investiguem os efeitos a longo prazo da exposição a agrotóxicos.

Neste trabalho, o grupo-controle não apresentou alteração nos níveis de colinesterase, já o grupo de indivíduos em exposição aos pesticidas apresentou 13,9% dos resultados com alteração dos níveis de colinesterase, fato que não era esperado, uma vez que, a maioria está exposta a altas concentrações de organofosforados. Uma possível justificativa para este resultado é o fato da existência de monitoramento periódico desta enzima seguida de temporadas de abstinência quando o teste é positivo.

Com relação a análise citogenética, observou-se que dos 36 indivíduos estudados, 58,3% apresentaram alteração. Estes números demonstram que as alterações genéticas independem do nível

de colinesterase sanguíneo e sugerem que a exposição é um fator determinante para aparecimento de alterações genéticas. As alterações encontradas e respectivas frequências foram: perda cromossômica (8,3%), alterações estruturais (5,6%), quebras cromossômicas (27,2%) e endoduplicações (11,1%) (Figura 2), alterações descritas anteriormente em estudos que envolviam agrotóxicos (Kourakis et al., 1992; Shaham et al., 2001; Bolognesi, 2003).

Na tentativa de explicar os diferentes tipos alterações genéticas encontradas, os indivíduos expostos aos agrotóxicos foram separados em dois grupos, os positivos e os negativos para danos genéticos, e posteriormente subdivididos em subgrupos com relação ao resultado das análises de colinesterase (Tabela 1).

Não foi encontrada correlação entre a classe toxicológica do composto utilizado e o tipo de dano encontrado nos indivíduos, pois todos os indivíduos que apresentaram danos faziam uso de pelo menos um composto pertencente à classe toxicológica I

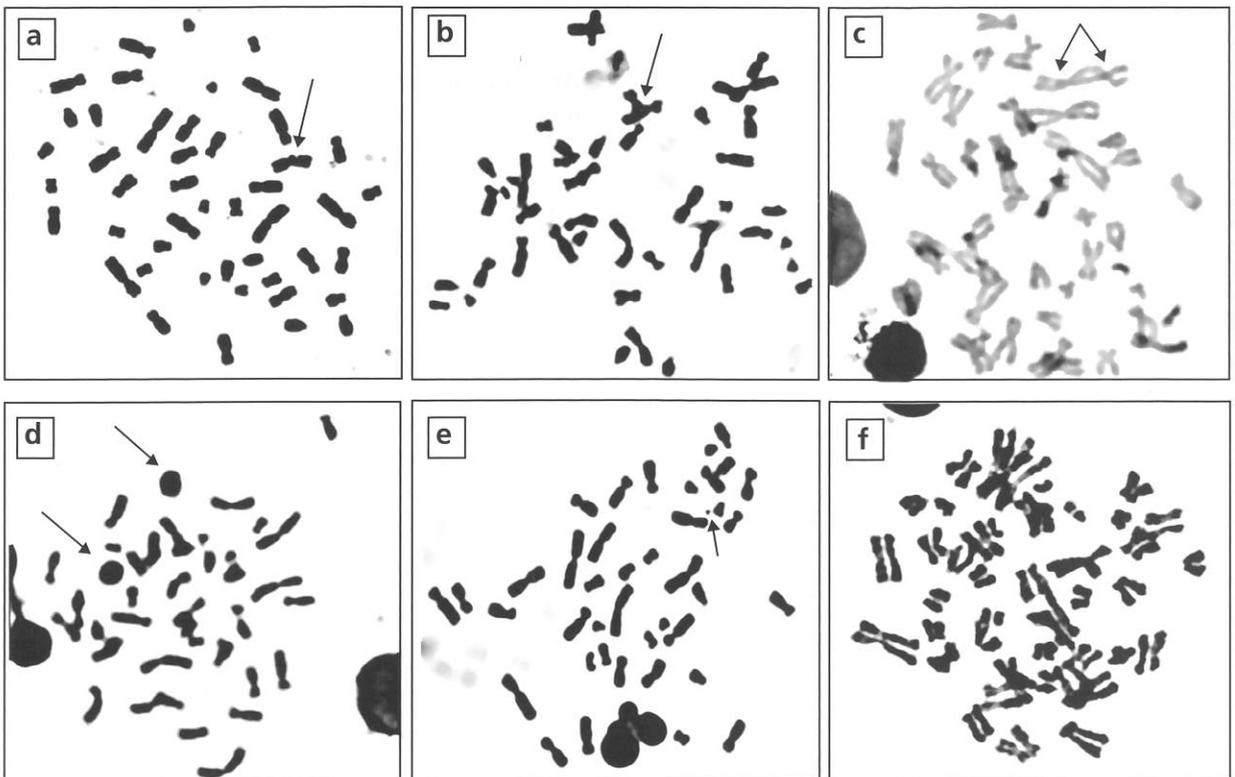


Figura 2: Alterações encontradas nos indivíduos expostos a agrotóxicos. a) a seta indica quebra cromossômica. b) seta indica cromossomo trirradial. c) seta indica cromossomo diacêntrico. d) nas setas indicação de cromossomo circular (em anel). e) seta indica a presença de fragmento. f) endoduplicação do conjunto cromossômico. São Miguel Arcanjo (SP), 2009.

(extremamente tóxico), sendo que o Triazol foi o composto mais utilizado.

Os indivíduos que apresentaram endoduplicação utilizam piretróides nas suas lavouras e fazem tratamento médico com aminofilina, sendo esta, de acordo com a NBR-14725 (Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químico - FISPQ), contra-indicada para indivíduos que estão em contato com piretróides.

Estudos mostram que a exposição a agentes xenobióticos, no caso os agrotóxicos, aumentam a frequência de danos no material genético (Moreira *et al.*, 2002). Logo, a exposição aos pesticidas é fator importante no aparecimento de alterações genéticas, devendo ser melhor estudada para garantir a saúde do trabalhador.

DISCUSSÃO

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que o grupo estudado está exposto a uma grande carga de diferentes tipos de agroquímicos e esta exposição foi responsável pelas alterações genéticas encontradas, uma vez que, não houve significância nos outros fatores levantados. Desta maneira, considera-se que a utilização de equipamento de proteção é de extrema importância para saúde do trabalhador.

O teste de colinesterase não é suficiente para excluir o dano causado pela exposição a agrotóxicos. A colinesterase mede a intoxicação do indivíduo, porém alterações genéticas podem sugerir aumento no risco de aparecimento de tumores. Os testes que medem o nível de colinesterase não apresentam ligação às alterações cromossômicas encontradas, logo, mesmo indivíduos com níveis normais, estão sujeitos a danos no material genético.

A resposta a exposição é dependente do metabolismo de cada indivíduo, sendo que este metabolismo é dependente de genes que podem apresentar polimorfismos genéticos levando a síntese diferenciada das enzimas de biotransformação das fases I e II. A alteração no metabolismo destes compostos pode ser responsável pela maior suscetibilidade a danos cromossômicos (Raunio *et al.*, 1995), sendo um fator de grande influência para aparição de danos no material genético.

A interação entre os agroquímicos e medicamentos tem sido relatada na literatura (Mertens *et al.*, 1976; Fenyvesi *et al.*, 1985) e indica que existe a necessidade de se considerar a atividade profissional no momento de indicação dos medicamentos. Como exemplo de algumas das interações de agroquímicos e medicamentos destacam-se as entre o pesticida organofosforado mevinfós e atropina (Mertens *et al.*, 1976) e do fungicida thiram e fármacos que agem no sistema nervoso central (Fenyvesi *et al.*, 1985).

Tabela 1. Dados de idade, tempo que trabalha com agricultura, média diária que trabalha realizando pulverização com relação a alterações citogenéticas e alterações na colinesterase encontradas no estudo. São Miguel Arcanjo (SP), 2009.

Fator analisado	Não alterados citogeneticamente				Alterados citogeneticamente			
	Colinesterase				Colinesterase			
	Normal		Alterada		Normal		Alterada	
	M	DP	M	DP	M	DP	M	DP
Idade	39,0	11,5	37,5	4,9	43,0	9,6	49,0	11,2
Tempo que Trabalha com Agricultura (anos)	12,0	11,5	14,0	0,7	10,0	10,5	18,5	12,0
Tempo médio de pulverização (horas)	1,0	2,2	1,0	3,5	1,0	1,4	2,0	2,0

M: média; DP: desvio-padrão.

Neste contexto, este estudo conclui que uma investigação mais ampla deve ser realizada na tentativa de monitorar o estado de saúde dos indivíduos que estão expostos a agentes químicos na agricultura.

Todos os fatores citados devem fazer parte dos cuidados com a saúde do trabalhador juntamente com maior atenção a educação com relação à importância da utilização do equipamento de proteção, a fim de que estes possam ter uma melhor qualidade de vida.

REFERÊNCIAS

- Bolognesi C. (2003). Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. *Mutation Research*, 543(3):251-72.
- Brêga S.M.; Vassilieff L.; Almeida A.; Mercadante A.; Bissacot D.; Cury, P.R. & Freire-Maia, D.V. (1998). Clinical, cytogenetic and toxicological studies in rural workers exposed to pesticides in Botucatu, São Paulo, Brazil. *Cadernos de Saúde Pública*, 14(3):109-15.
- Cavenee, W.K.; Dryja, T.P.; Phillips, R.A.; Benedict, W.F.; Godbout, R.; Gallie, B.I.; Murphree, A.I.; Strong, L.A. & White, R.L. (1983). Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma. *Nature*, 305:779-84.
- Faria, N.M.X.; Facchini, L.A.; Fassa, A.C.G. & Tomasi, E. (2004). Trabalho rural e intoxicações por agrotóxicos. *Cadernos de Saúde Pública*, 20(5):1298-308.
- Faria, N.M.X.; Fassa, A.G. & Facchini, L.A. (2007). Intoxicação por agrotóxicos no Brasil: os sistemas oficiais de informação e desafios para realização de estudos epidemiológicos. *Ciência & Saúde Coletiva*, 12(1):25-38.
- Fenyvesi, G.; Botos, M. & Ivan, J. (1985). Pesticide-drug interactions in rats. *Archives of Toxicology Supplement*, 8:269-71.
- FUNASA. Avaliação da Colinesterase Sanguínea Humana. Disponível em: <http://www.portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/ipcv_012.pdf>. (Acesso 6 maio 2009).
- Klein, G. (1981). The role of gene dosage and genetic transposition in carcinogenesis. *Nature*, 294:313-8.
- Knedel, M. & Böttger, R. (1967). Eine kinetische Methode zur Bestimmung der Aktivität der Pseudocholinesterase (Acylcholinacylhydrolase 3.1.1.8). *Klinische Wochenschrift*, 45:325-7.
- Kourakis, A.; Mouratidou, M.; Kokkinos, G.; Barbouti, A.; Kotsis, A.; Mourelatos, D. & Dozi-Vassiliades, J. (1992). Frequencies of chromosomal aberrations in pesticide sprayers working in plastic green houses. *Mutation Research*, 279(2):145-8.
- Maroni, M. & Fait, A. (1993). Health effects in man from long-term exposure to pesticides. *Toxicology*, 78:1-180.
- Mertens, H.W.; Steen, J.A. & Lewis, M.F. (1976). Some behavioral effects of pesticides: the interaction of mevinphos and atropine in pigeons. *Aviation, Space and Environmental Medicine*, 47:137-41.
- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (2003). Base de dados de produtos agrotóxicos e fitossanitários, Disponível em: http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. (Acesso: 20 maio 2009).
- Moorhead, P.S.; Nowell, P.C.; Mellman, W.J.; Battips, D.M. & Hungerford, D.A. (1960). Chromosome preparations of leukocyte cultures from human peripheral blood. *Experimental Cell Research*, 32:609-12.
- Moreira, J.C.; Jacob, S.C.; Peres, F.; Lima, J.S.; Meyer, A.; Oliveira-Silva, J.J.; Sarcinelli, P.N. Batista, D.F.; Egler, M.; Faria, M.V.C.; Araujo, A.J.; Kubota, H.K.; Soares, M.O.; Alves, S.R.; Moura, C.M. & Guri, R. (2002). Avaliação integrada do impacto do uso de agrotóxicos sobre a saúde humana em uma comunidade agrícola de Nova Friburgo, RJ. *Ciência & Saúde Coletiva*, 7(2):299-311.
- Nunes, M.V. & Tajara, E.H. (1998). Efeitos tardios dos praguicidas organoclorados no homem. *Revista de Saúde Pública*, 32(4):372-82.
- Organização Internacional do Trabalho. (1998). Agricultura y sectores basados en recursos biológicos[OIT]. *Enciclopedia de Salud y Seguridad en el Trabajo*, 3(64):64.2-64.77.
- Organização Pan-Americana de Saúde. (1996). Manual de vigilância da saúde de populações expostas a agrotóxicos. Brasília: OPAS.
- Organization for Economic Co-operation and Development. (1997). Guidance document for the conduct of studies of occupational exposure to pesticides during agricultural application. Paris.
- Raunio, H.; Husgafvel-Pursiainen, K.; Anttila, S.; Hietanen, E.; Hirvonen, A. & Pelkonen, O. (1995). Diagnosis of polymorphisms in carcinogen-activating and inactivating enzymes and cancer susceptibility. *Gene*, 159(1):113-21.
- Reynolds, P.; Von, B.J.; Gunie, R.B.; Goldberg, D.E.; Hertz, A. & Harnly, M.E. (2002). Childhood cancer and agricultural pesticide use: an ecologic study in California. *Environmental Health Perspectives*, 110(3):319-24.
- Rowley, J.D. (1984). Biological implications of consistent chromosome rearrangements in leukemia and lymphoma. *Cancer Research*, 44(48):3159-68.
- Shabtai, E.; Bichacho, S. & Halbrecht, L. (1979). Cytogenetic observation in infertile men working with insecticidal compounds. *Acta Genetica Medical et Gemellologiae*, 27:51-6.
- Shaham, J.; Kaufman, Z.; Gurvich, R. & Levi, Z. (2001). Frequency of sister-chromatid exchange among greenhouse farmers exposed to pesticides. *Mutation Research*, 491(1-2):71-80.
- Vogelstein, B. & Kinzler, K.W. (1998). *The genetic basis of human cancer*. New York: McGraw-Hill.

Recebido em: 25/1/2010

Versão final reapresentada em: 8/3/2010

Aprovado: 30/3/2010