

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**

**AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMO DE GENES DE METABOLIZAÇÃO
GSTT1, *GSTM1*, *GSTP1* E *PON1* NA SUSCETIBILIDADE INDIVIDUAL A
DANOS DE DNA EM SOJICULTORES DE ESPUMOSO - RS**

Nayê Balzan Schneider

**Orientadora: Kátia Kvitko
Co-orientadora: Fernanda Rabaioli da Silva**

Trabalho de conclusão de curso submetido ao Instituto de Biociências UFRGS como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

A ser enviado para o periódico Genetics and Molecular Biology.

Porto Alegre
2011

**AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMO DE GENES DE METABOLIZAÇÃO
GSTT1, GSTM1, GSTP1 E PON1 NA SUSCETIBILIDADE INDIVIDUAL A
DANOS DE DNA EM SOJICULTORES DE ESPUMOSO - RS**

Nayê Balzan Schneider¹; Fernanda Rabaioli da Silva¹; Paula Rohr; Danieli Benedetti²; Juliana da Silva²; Kátia Kvitko¹.

¹ Departamento de Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. ² Laboratório de Genética Toxicológica, Programa de Pós-Graduação em Genética e Toxicologia Aplicada, Universidade Luterana do Brasil – ULBRA, Canoas, Rio Grande do Sul, Brasil.

Nayê Balzan Schneider - Laboratório de Imunogenética, prédio 43423. Av. Bento Gonçalves, 9500. Porto Alegre – RS.

e-mail: nayebalzans@yahoo.com.br

Resumo

Os trabalhadores agrícolas estão constantemente expostos aos pesticidas que utilizam na lavoura, esta exposição pode ser responsável por danos genéticos, causando risco à sua saúde. O objetivo desta pesquisa foi avaliar os possíveis efeitos genotóxicos e mutagênicos em sojicultores da cidade de Espumoso, RS, e verificar a influência da suscetibilidade individual na resposta à exposição, analisando os genes de metabolização *PON1*, *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1*. Foram avaliados 97 indivíduos expostos e 87 não expostos. As amostras de sangue periférico e da mucosa oral utilizadas no ensaio cometa e no teste de micronúcleos, respectivamente, foram coletadas entre janeiro e fevereiro de 2008 e junho e julho de 2009. Foi observado aumento na frequência de micronúcleos no grupo de indivíduos expostos em comparação ao não exposto ($P < 0,01$ -Mann-Whitney), bem como, aumento no índice (ID) e na frequência de dano (FD) ($P < 0,01$ -Mann-Whitney). Na análise dos polimorfismos genéticos, nos resultados obtidos pelos biomarcadores de exposição e efeito, não foi visualizada influência dos genótipos na determinação do dano ao DNA. Estes resultados demonstram que a exposição aos pesticidas provavelmente está relacionada com o aumento no nível de dano ao DNA, não havendo modulação dos genes de metabolização avaliados.

Palavras - chave: pesticidas, sojicultura, risco ocupacional, ensaio cometa, teste de micronúcleos.

Introdução

A cultura de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) no Brasil teve seu início por volta de 1950, no Estado do Rio Grande do Sul. Atualmente, o Brasil é responsável por 26,8% da produção mundial de soja, sendo o segundo país com maior cultivo desta oleaginosa (Embrapa).

No Rio Grande do Sul, a cultura de soja é realizada em latifúndios assim como em pequenas e médias propriedades rurais, sendo estas últimas características das porções norte e nordeste do estado (Sieben & Machado, 2006). Na região norte destaca-se o município de Espumoso, o qual possui 410 km², de uma área total de 783km², ocupados pelas lavouras de soja (IBGE, 2009).

A agricultura tem se transformado nos últimos anos, devido à elevada utilização de pesticidas e fertilizantes, com o intuito de aumentar a proteção e a produção da plantação, assim como a qualidade dos alimentos (Maroni *et al.*, 2006). O Brasil é o terceiro mercado e o oitavo maior consumidor de agrotóxicos no mundo, sendo os herbicidas e inseticidas responsáveis por 60% dos produtos comercializados no país (Fairbanks, 2001).

Por pesticida, entende-se uma categoria de químicos criados especificamente para o controle de pestes, ervas daninha ou doenças que atingem as plantas (Bolognesi, 2003). Embora eficientes na manutenção da sanidade das plantas, estes produtos podem causar sérios danos à saúde dos agricultores, principalmente quando não fazem uso dos equipamentos de proteção individual (EPI), e das pessoas que indiretamente entram em contato com os resíduos de agrotóxicos presentes nos alimentos, na água e no solo. Este é um risco preocupante principalmente para os países em desenvolvimento, onde o trabalho agrícola é uma das atividades predominantes (Maroni *et al.*, 2006).

A toxicidade de vários compostos já foi avaliada e classificada quanto ao risco que podem causar, mas como a exposição a esses químicos normalmente ocorre através de misturas, o potencial genotóxico avaliado para cada composto individualmente não pode ser extrapolada aos humanos (Bolognesi, 2003). Além disso, a classificação toxicológica reflete basicamente a toxicidade aguda e não indica os riscos de doenças de evolução prolongada. Alguns exemplos desses efeitos tardios incluem câncer, doenças genéticas nas gerações seguintes, desordens de desenvolvimento, danos neurológicos e reprodutivos (Bolognesi *et al.*,

2011). Percebe-se que ainda há limites técnicos para as avaliações toxicológicas e ambientais que não permitem uma análise de risco perfeitamente conclusiva (Garcia e Alves Filho, 2005).

Quando o ambiente de trabalho pode converter-se em elemento agressor ao indivíduo, qualquer que seja a origem do agente agressor, existe a possibilidade de dano para a saúde do trabalhador (Mauro *et al.*, 2004), o que pode ser caracterizado como risco ou exposição ocupacional.

Devido a evidências de efeitos carcinogênicos causados por pesticidas e o crescente risco de desenvolvimento de malignidades em populações expostas ocupacionalmente, tem sido necessário estudos envolvendo trabalhadores expostos (Singh *et al.*, 2010). O biomonitoramento ocupacional examina a exposição de trabalhadores a uma variedade de agentes químicos, biológicos ou fisiológicos para determinar se a exposição resulta em um maior risco de efeitos adversos à saúde (Valverde & Rojas, 2009).

Biomarcadores usados em estudos da saúde humana são normalmente divididos em três classes: biomarcadores de exposição, efeito e suscetibilidade. Biomarcadores de exposição são preferencialmente específicos para a exposição a químicos, enquanto biomarcadores de efeito normalmente são inespecíficos para o agente em questão e tem potencial maior em refletir exposições contínuas (Silins & Hogberg, 2011).

Vários estudos de biomonitoramento utilizam o teste de micronúcleo em linfócitos binucleados ou em células da mucosa oral (Bolognesi *et al.*, 2011), visto que o dano genético a nível cromossomal, por alteração no número ou na estrutura do cromossomo pode ser medido pela frequência de micronúcleos (Bolognesi, 2003), sendo este caracterizado como biomarcador de efeito. O ensaio cometa é um biomarcador de exposição e também tem sido usado para o biomonitoramento de populações expostas a vários xenobióticos, detecta o dano revelando quebras simples e/ou duplas na fita de DNA, sítios álcali-lábeis e crosslinks. Enquanto que os polimorfismos genéticos, responsáveis pelas diferenças entre os indivíduos, são conhecidos como biomarcadores de suscetibilidade para mutações, câncer e outras doenças (Bolognesi, 2003).

Diferenças individuais ou nas condições de exposição, ocupacional e ambiental, podem alterar o risco de intoxicação (Faria *et al.*, 2001). Esta suscetibilidade individual, determinada pelo polimorfismo de diversos genes, é um dos fatores que determinam as diferenças

individuais e desempenham um papel importante na resposta à exposição aos pesticidas. Qualquer polimorfismo que afete o metabolismo do xenobiótico ou a resposta celular ao dano no DNA pode alterar a sensibilidade do indivíduo a carcinógenos (Norppa, 2004).

Genes relacionados ao metabolismo de pesticidas, como o gene *PON1*, que codifica a enzima paraoxonase, e aos genes *GSTM1*, *GSTP1* e *GSTT1*, responsáveis pela codificação das glutatona S-transferase (GST), ambas enzimas de metabolização, são estudados em trabalhos com populações expostas a pesticidas, a fim de avaliar sua influência na resposta à exposição sofrida. Estas enzimas reconhecem e convertem os xenobióticos a formas solúveis em água podendo ser eliminadas pelo organismo. A enzima PON1, é responsável pela detoxificação dos pesticidas organofosforados (Singh *et al.*, 2011), já as GSTs são uma família de enzimas que catalisam a conjugação da glutatona com diferentes compostos eletrofílicos, o que facilita a remoção e protege a célula dos efeitos tóxicos dos xenobióticos (McIlwain *et al.*, 2006).

Como os polimorfismos em genes de metabolização são considerados biomarcadores de suscetibilidade e são responsáveis pela modulação da resposta individual à exposição à xenobióticos, o presente estudo busca analisar a influência dos polimorfismos dos genes *PON1(Q192R)*, *GSTM1*, *GSTP1* e *GSTT1 (I105V)* em biomarcadores de exposição e efeito, teste cometa e teste de micronúcleo, respectivamente.

Material e Métodos

Amostra

O estudo envolveu um total de 184 indivíduos entre homens e mulheres do município de Espumoso (28° 43' 30" S, 52° 51' 0" W), região norte do Estado do Rio Grande do Sul. Desses, 87 são agricultores que durante o cultivo da soja ficam expostos aos pesticidas, e 97 são indivíduos que residem no território urbano da cidade e não são expostos aos pesticidas.

As amostras de sangue periférico e da mucosa oral foram coletadas entre janeiro e fevereiro de 2008 e entre junho e julho de 2009. Todos os indivíduos responderam a um Termo de Consentimento Informado e a um questionário recomendado pela Comissão Internacional de Proteção Ambiental contra mutagênicos e cancerígenos (Carrano & Natarajan, 1988), com o

objetivo de caracterizá-los quanto ao seu estilo de vida, idade, sexo, tempo de exposição, uso de equipamentos de proteção (EPIs), entre outros. O projeto que envolveu a coleta destas amostras foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos e Animais da ULBRA.

A extração de DNA a partir das amostras de sangue foi realizada entre abril e junho de 2011 com a técnica desenvolvida por Lahiri & Nurnberger, 1991.

Detecção dos genótipos

A genotipagem dos genes *GSTT1* (cromossomo 22q11.23) e *GSTM1* (cromossomo 1p13.3) foi realizada pela técnica de PCR multiplex, através de uma reação constituída por 100 ng de DNA genômico, 10 pmol de cada primer, 10 mM Tris HCl, 4.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0,8 µM dNTPs e 1U Taq DNA polimerase em um volume total de 50 µl. A amplificação iniciou com a desnaturação a 94°C por 5 min, seguidos por seis ciclos touchdown (1 min - 94°C, 59°C - 2min e 1 min - 72°C) e 30 ciclos de 94°C por 1min, 55°C por 1min, 72°C por 1min e extensão final a 72°C por 5min. O produto da amplificação foi visualizado em gel de agarose 3% corado com brometo de etídeo, onde se pode observar a presença ou ausência dos fragmentos de *GSTM1* (480pb) e *GSTT1* (215pb), sendo que *GSTP1* (176pb) foi usado como controle da reação.

Para a genotipagem do gene *GSTP1* (cromossomo 11q13), onde foi analisado o polimorfismo *I105V* a reação de PCR envolveu 100ng de DNA genômico, 10 mM Tris HCl, 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0.4 µM de dNTPs, 1U de Taq DNA polimerase e 10pmol de cada primer, em um volume total de 25µl. A amplificação ocorreu a partir de desnaturação inicial a 94°C por 5min seguida por 35 ciclos de 94°C-30 seg, 60°C-30 seg, 72°C-30 seg e extensão final a 72°C por 5min. A clivagem foi realizada com 1U da enzima *Bsmal* e 5 µl do produto do PCR, a visualização dos fragmentos foi em gel de poliacrilamida 8%, onde pode-se observar os fragmentos de 176pb referentes à isoleucina e os fragmentos de clivados de 91 e 85pb de valina.

Os genótipos do polimorfismo (Q192R) do gene *PON1* (cromossomo 7q21.3) foram determinados pela técnica de PCR/RFLP (Polymerase Chain Reaction/Restriction Fragment Length Polymorphism). Sendo que a reação foi composta por 100ng de DNA genômico, 10mM

Tris HCl, 50 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 0.8 μM de dNTPs, 1U de Taq DNA polimerase e 10pmol de cada primer, em um volume total de 25μl. A amplificação envolveu desnaturação inicial a 95°C por 5min seguida por 34 ciclos de 95°C-1min, 60°C-30seg, 72°C-1min e a extensão final a 72°C por 5min. Para reação de clivagem foram usados 5 μl do produto do PCR e 1U da enzima *Afl*, a visualização foi em gel de agarose 3% corado com brometo de etídeo. Pode-se observar os alelos pelos respectivos tamanhos, 99pb para glutamina (não clivado) e fragmentos de 66 e 33pb para arginina.

Análise dos biomarcadores de exposição (ensaio cometa) e de efeito (teste de micronúcleo)

O teste de micronúcleos (MN) e o ensaio cometa já haviam sido previamente realizados em trabalhos anteriores feitos pelo grupo de pesquisa.

O ensaio cometa foi realizado conforme descrito por Singh *et al.* (1988) e modificado por Silva *et al.* (2000). As lâminas foram recobertas com agarose e 5 μL de células sanguíneas foram embebidas em 95 μL de agarose com baixo ponto de fusão, após a solidificação da mistura as lâminas foram mantidas em tampão de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 10,0-10,5) contendo 1% (v/v) de Triton X-100 e 10% (v/v) de dimetilsulfóxido (DMSO) por no mínimo 1h e no máximo 7 dias. Após a lise as lâminas foram colocadas na cubeta de eletroforese horizontal, sendo cobertas por solução tampão alcalina (300 mM NaOH e 1 mM EDTA, pH>13) recém preparado, onde permaneceram por 20 minutos. Após este período, o DNA foi submetido à eletroforese por 20 minutos a 25 volts (0,90 V/cm) e 300 mA. As lâminas então foram neutralizadas com solução tampão 0,4M Tris (pH 7,5) e coradas com nitrato de prata.

Foram avaliadas 100 células por indivíduo de forma aleatória (50 células de cada uma das lâminas em duplicata) com microscópio óptico sob aumento de 40X. Dois parâmetros foram considerados: índice de dano (ID), no qual cada célula foi designada entre 5 diferentes classes conforme o tamanho da cauda em relação à cabeça (0 = sem lesão a 4 = lesão máxima), sendo que este índice pode variar de zero (100 células x classe 0) a 400 (100 x classe 4); e frequência de dano (FD), que corresponde a porcentagem de células com dano.

Para realização do teste de micronúcleo, células da mucosa oral foram coletadas por raspagem na parte interna da bochecha (lado direito e lado esquerdo) com o auxílio de uma escova de coleta de tecido cervical e condicionadas em tubos para centrifugação tipo falcon com 40 mL

de solução tampão fosfato, pH 6,8 e mantidas sob refrigeração para transporte. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 1.000 rpm e o sedimento obtido (0,5 mL) recebeu 8 mL de ácido acético e metanol 3:1, processo realizado por mais duas vezes para obtenção de 0,3 mL de solução final. Após, o sedimento foi fixado em uma lâmina, e estas foram reservadas por um período correspondente a uma noite. As lâminas foram submersas em HCL (1 N), coradas com uma mistura de 70 mL de Giemsa e 30 mL de tampão fosfato (pH 5,8) por 5 minutos, secas a temperatura ambiente. As lâminas coradas foram avaliadas por microscopia óptica e a contagem celular foi realizada em 2.000 células por indivíduo (lâminas em duplicata).

Análise estatística

A comparação entre frequência genotípica e alélica dos grupos de indivíduos expostos e não expostos foi calculada com o teste de Fisher. Para verificar se a distribuição genotípica estava em equilíbrio de Hardy–Weinberg foi utilizado o teste χ^2 . A análise da distribuição normal das variáveis foi realizada pelo teste Kolmogorov–Smirnov. Para a análise da frequência de micronúcleo, índice de dano e frequência de dano foi utilizado o teste não-paramétrico Mann–Whitney U. Na análise da influência dos genótipos nos resultados dos testes biomarcadores foi utilizado o teste t de Student. Todas as análises foram realizadas com o programa estatístico SPSS 15.0.

Resultados

A caracterização da população estudada é especificada na Tabela 1. As frequências genotípicas e alélicas dos genes *GSTM1*, *GST1*, *GSTP1* e *PON1* dos indivíduos expostos e não-expostos são mostradas na Tabela 2, ambas não diferem entre os dois grupos em todos os polimorfismos avaliados. Em relação à população total estudada, as frequências alélicas foram *PON1 192Gln*: 0,793; *PON1 192Arg*: 0,207; *GSTP1 105Ile*: 0,667 e *GSTP1 105Val*: 0,333. A distribuição de todos os genótipos nos dois grupos estudados encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

A Tabela 3 mostra os resultados dos testes de exposição (ensaio cometa) e de efeito (teste de micronúcleo) nos grupos de indivíduos expostos e não expostos. Foi encontrado

aumento significativo da frequência de dano (FD), do índice de dano (ID) e do número de micronúcleos no grupo exposto em relação ao não exposto (teste de Mann–Whitney U, $P < 0,01$).

A Tabela 4 mostra o efeito dos polimorfismos nos diferentes biomarcadores (MN, ID e FD) nos indivíduos expostos e não-expostos, como poucos indivíduos apresentaram o genótipo homocigoto mutante nos genes *PON1* e *GSTP1* eles foram unidos aos heterocigotos na análise estatística. Em ambos os grupos não houve diferença significativa dos genótipos dos genes trabalhados nos resultados dos biomarcadores, embora tenha sido observada uma tendência de aumento na frequência de micronúcleos nos indivíduos do grupo exposto com genótipo *PON1 Gln/Gln* em comparação com os indivíduos *PON1 Arg/-* (Teste t de Estud - $P = 0,076$).

Discussão

Pesticidas são usados intensivamente em todo o mundo, sendo que possíveis abusos ou mau uso podem levar a níveis significantes de exposição, particularmente entre indivíduos expostos ocupacionalmente (da Silva *et al.*, 2008). Além do problema dessa exposição direta aos pesticidas ou à mistura deles, ocorre ainda exposição indireta, pelo contato com os resíduos de agrotóxicos presentes nos alimentos, água e solo. Muitos pesticidas classificados como prováveis agentes carcinogênicos pelas Agências Internacionais são banidos ou têm o uso restrito em alguns países, apesar disso, devido sua bioacumulação, persistem nos ecossistemas e são dispersos no ambiente (Bolognesi *et al.*, 2011). Por esses motivos os pesticidas são considerados potenciais genotóxicos e como tal, um risco primário para efeitos de longo prazo, como os carcinogênicos, reprodutivos e de desenvolvimento de doenças degenerativas (Bolognesi *et al.*, 2011).

O teste de micronúcleo em células da mucosa oral, utilizado neste trabalho para identificar se a exposição aos pesticidas sofridas pelos sojicultores está levando a um aumento no dano ao DNA, é um método reconhecido por sua sensibilidade de monitorar danos genéticos em populações humanas ocupacionalmente expostas (Majer *et al.*, 2001).

Os micronúcleos em células da mucosa oral, formados durante a mitose das camadas basais do epitélio, são fragmentos extracromossomais de DNA que resultam de fragmentos de cromossomos ou de cromossomos inteiros que não foram incluídos ao núcleo principal das células filhas. Assim, a formação de micronúcleos é induzida por substâncias que causam quebra nos cromossomos (clastogênicas) e por substâncias que afetam a formação do fuso mitótico (aneugênicas) (Majer *et al.*, 2001).

O ensaio cometa (SCGE assay - single cell gel electrophoresis assay) tem sido cada vez mais usado em estudos de biomonitoramento de populações por ser um teste fácil, rápido e sensível o bastante para detectar baixos níveis de danos ao DNA (Faust, 2004). O ensaio cometa alcalino, utilizado neste estudo, detecta uma mistura de lesões no DNA como quebras de fita duplas e simples, sítiosapurínicos/apirimídicos - AP e quebras associadas à replicação (Dusinska & Collins, 2008).

Neste estudo observou-se que a exposição aos agrotóxicos aos quais os sojicultores estão expostos levou ao aumento no dano ao DNA. Este aumento foi detectado pelo ensaio cometa, o qual demonstrou ID e FD significativamente maiores no grupo exposto em relação ao não exposto, e também pelo teste de micronúcleo, que demonstrou aumento significativo de células com micronúcleos no grupo de indivíduos expostos aos pesticidas. Assim, pode-se dizer que devido à exposição ocupacional esses agricultores sofrem efeito genotóxico e mutagênico.

Os sojicultores avaliados estão envolvidos tanto na preparação da mistura de pesticidas utilizados na lavoura quanto na sua aplicação, a qual é realizada com tratores e bombas manuais. Bolognesi (2003) relata que pessoas envolvidas na preparação e aplicação através da pulverização de pesticidas são o grupo que mais sofre exposição devido à formação de aerossóis, que são constantemente inalados. Pelo fato de as células da mucosa oral estar em contato direto com o xenobiótico esse efeito pode ser percebido pelo teste de micronúcleo, o qual apresentou uma frequência maior de micronúcleos no grupo exposto em relação ao não exposto. Resultados que concordam com os nossos foram encontrados por Bortoli *et al.* (2009) na análise do dano ao DNA de sojicultores de Fortaleza dos Valos, Rio Grande do Sul, pelo teste de micronúcleo também em mucosa oral.

O ensaio cometa em sangue periférico mostra que a exposição ocupacional induziu ao aumento do dano ao DNA não só em células diretamente expostas, o que reforça a evidência do dano devido à exposição. Vários trabalhos utilizam células sanguíneas porque elas circulam pelo corpo, e seu estado celular, nuclear e metabólico reflete a extensão total da exposição (Valverde & Rojas, 2009).

Muitos estudos têm sugerido que os polimorfismos genéticos podem afetar o nível do dano genético associado com a exposição ocupacional a agentes genotóxicos (Iarmarcovai, 2008). A determinação dos polimorfismos está se tornando um aspecto importante que pode aumentar a sensibilidade e a especificidade dos ensaios e de grupos sensíveis (Norppa, 1997). Vários polimorfismos de enzimas que metabolizam xenobióticos têm sido identificados por afetar os resultados de biomarcadores citogenéticos (Norppa, 2004), já que são capazes de ativar ou inativar compostos potencialmente genotóxicos e carcinogênicos. A ativação metabólica e inativação de agentes genotóxicos ocorrem por enzimas de metabolização de Fase I e Fase II envolvendo múltiplas interações (Heuser *et al.*, 2007).

A super família da Glutathione S-transferase está envolvida na Fase II do metabolismo, transformando intermediários reativos em metabólitos menos reativos para facilitar a excreção (Kirsch-Volders, 2006) através da conjugação dessas moléculas com a glutathione, o que as torna menos tóxicas (Idle, 1991). As GSTs possuem um importante papel, fornecendo proteção contra compostos eletrofilicos e produtos do estresse oxidativo, sugerindo que estas enzimas fazem parte de um mecanismo de resposta adaptativa aos danos causados por compostos químicos (Hayes, 1995).

GST M1 (μ), T1 (θ) e P1 (π) são importantes enzimas GSTs envolvidas no metabolismo de muitos compostos endógenos e exógenos (Singh *et al.*, 2011). Polimorfismos em *GSTM1* e *GSTT1* conferem ao gene deleções que resultam em alelos nulos, indivíduos homocigotos para essa deleção não possuem atividade enzimática (Wu, 1997). Portanto o genótipo nulo é relacionado com aumento no risco de malignidades como uma consequência da menor capacidade de detoxificar possíveis carcinógenos (McIlwain, 2006).

As variantes do gene *GSTP1* também resultam em variação na atividade enzimática embora os resultados de estudos sejam contraditórios. Segundo Watson *et al.* (1998) a substituição *Ile105Val* resulta em uma substancial redução na atividade catalítica e diminui a

capacidade de detoxificação em indivíduos *Val105* quando comparados aos que possuem *Ile105*, já Hu *et al.* (1997) e Sundberg *et al.* (1998) verificaram resultados contrários. Estudos mais recentes mostram aumento no dano ao DNA em indivíduos que possuem o genótipo *GSTP1 Ile/Ile* quando comparado com *GSTP1 Ile/Val* e *Val/Val* (Liu *et al.*, 2006; Wong *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2011).

Em nosso trabalho não foram encontradas diferenças de dano ao DNA de acordo com os genótipos de *GSTT1*, *GSTM1* e *GSTP1* nos dois grupos estudados. Em outros trabalhos também não foi observada o efeito dos polimorfismos genéticos dos GSTs nos biomarcadores avaliados (van Delft *et al.*, 2001; Vilarini *et al.*, 2008; da Silva *et al.*, 2008). Segundo Iarmarcovai (2005) uma interação positiva entre a exposição a um agente genotóxico e determinados genótipos pode ser informativa, mas uma associação nula não descarta essa interação. No caso do nosso estudo, o tamanho amostral pode ter prejudicado a visualização dessa associação por ter reduzido o poder estatístico das análises.

O outro polimorfismo analisado nesse estudo foi o do gene *PON1*, o qual foi primeiramente descrito pela sua capacidade de hidrolisar organofosforados e pesticidas (Précourt *et al.*, 2011). Polimorfismos do gene *PON1* determinam o nível de atividade enzimática variando a sensibilidade à intoxicação por pesticidas (Humbert *et al.*, 1993). Singh *et al.* 2011 relatam uma associação entre o genótipo *PON1 Gln/Gln* com o aumento no risco de dano ao DNA em trabalhadores expostos ocupacionalmente a organofosforados, já que o alelo *Gln192* resulta em menor atividade da enzima paraoxonase, o que torna os indivíduos portadores desse genótipo mais suscetíveis aos efeitos tóxicos dos organofosforados.

No presente trabalho não foi visualizado um resultado significativo que relacione determinado polimorfismo do gene *PON1* com aumento ou diminuição no dano ao DNA, mas foi observada uma tendência no aumento do número de micronúcleos nos indivíduos expostos *Gln/Gln* em relação aos *Arg/-* ($P = 0,076$), o que concorda com resultados de da Silva *et al.* (2008), que encontrou resultados significantes mostrando um aumento na frequência de micronúcleos em indivíduos *PON1 Gln/Gln* comparados aos *PON1 Arg/-*, em um estudo que envolveu viticultores do Rio Grande do Sul. A falta de significância estatística, apesar da tendência de proteção do alelo *PON1 Arg* observada em nosso estudo, pode ser explicada pela amostra limitada.

Já está bem estabelecido que a distribuição polimórfica das enzimas metabolizadoras nas diferentes populações influencia na susceptibilidade ao desenvolvimento de doenças ambientais, sendo de grande importância o conhecimento da frequência destes genes nas diferentes etnias, visando gerar uma forma efetiva de prevenção (Au *et al.*, 1999). Na população estudada, o alelo variante mostrou-se menos frequente nos indivíduos expostos e não expostos tanto para o gene *PON1* como para *GSTP1*. As frequências alélicas e genotípicas de *PON1* observadas neste trabalho assemelham-se às encontradas por Rohr *et al.* (2011), que analisou viticultores de Caxias do Sul, região nordeste do estado. As frequências genotípicas do gene *GSTP1* assemelham-se as encontradas por Rossini *et al.* (2002) em uma amostra do Rio de Janeiro.

Conclui-se com os resultados positivos dos testes biomarcadores, de efeito e exposição, que os sojicultores estão sofrendo efeitos danosos devido à exposição aos pesticidas. Como o Brasil é um país com forte cultura de utilização de agrotóxicos essas evidências de toxicidade indicam a necessidade de uma reeducação na utilização dos pesticidas, assim com a necessidade de uso dos equipamentos de proteção individual para que os potenciais riscos à saúde possam ser diminuídos. A influência dos genes de metabolização estudados no dano ao DNA não pode ser observada nesse estudo, embora tenha sido percebida uma tendência nos polimorfismos do gene *PON1* na modulação da frequência de MN nos indivíduos expostos.

Referências

- Au WW, Sierra-Torres CH, Cajas-Salazar N and Salama SA (1999) Inheritance of polymorphic metabolizing genes and environmental disease and quality of life. *Mutat Res* 428:131-140.
- Bolognesi C (2003) Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. *Mutat Res* 543:251-272.
- Bolognesi C, Creus A, Ostrosky-Wegman P and Marcos R (2011) Micronuclei and pesticide exposure. *Mutagenesis* 26:19-26.
- Bortoli GM, Azevedo MB and Silva LB (2009) Cytogenetic biomonitoring of Brazilian workers exposed to pesticides: micronucleus analysis in buccal epithelial cells of soybean growers. *Mutat Res.* 675:1-4.
- Carrano AV, Natarajan AT. (1988) International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens. ICPEMC publication no. 14. Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. *Mutat Res* 204:379-406.
- da Silva J, Moraes CR, Heuser VD, Andrade VM, Silva FR, Kvitko K, Emmel V, Rohr P, Bordin DL, Andreazza AC *et al.* (2008) Evaluation of genetic damage in a Brazilian population occupationally exposed to pesticides and its correlation with polymorphisms in metabolizing genes. *Mutagenesis* 23:415-22.
- Dusinska M and Collins AR. (2008) The comet assay in human biomonitoring: gene-environment interactions. *Mutagenesis* 23:191-205.
- Fairbanks M (2001) Defensivos agrícolas ampliam o mercado. *Revista Química e Derivados* 396:398-403.
- Faria NMX, Fassa ACG, Fachini LA (2007) Intoxicação por agrotóxicos no Brasil: os sistemas oficiais de informação e desafios para realização de estudos epidemiológicos. *Ciência & Saúde Coletiva*, 12:25-38.
- Faust F, Kassie F, Knasmüller S, Boedecker RH, Mann M, Mersch-Sundermann V (2004) The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies. *Mutat Res.* 566:209-29.
- Garcia EG e Alves Filho JP (2005) Aspectos de prevenção e controle de acidentes no trabalho com agrotóxicos. São Paulo:Fundacentro.

- Hayes JD, Pulford DJ (1995) The Glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST* and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 30:445-600.
- Heuser, V. D., Erdtmann, B., Kvitko, K., Rohr, P. and Da Silva, J. (2007) Evaluation of genetic damage in Brazilian footwear-workers: biomarkers of exposure, effect, and susceptibility. *Toxicology* 232:235–247.
- Hu X, Xia H, Srivastava SK, Herzog C, Awasthi YC, Ji X, Zimniak P, Singh SV (1997) Activity of four allelic forms of glutathione S-transferase hGSTP1-1 for diol epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biochem Biophys Res Commun*. 238:397-402.
- Humbert R, Adler DA, Disteché CM, Hassett C, Omiecinski CJ, Furlong CE (1993) The molecular basis of the human serum paraoxonase activity polymorphism. *Nat Genet*. 3:73-6.
- Iarmarcovai G, Bonassi S, Botta A, Baan RA, Orsière T (2008) Genetic polymorphisms and micronucleus formation: a review of the literature. *Mutat Res*. 658:215-33
- Idle JR (1991) Is environmental carcinogenesis modulated by host polymorphism? *Mutat. Res*. 247:259–266.
- Kirsch-Volders M, Mateuca RA, Roelants M, Tremp A, Zeiger E, Bonassi S, Holland N, Chang WP, Aka PV, Deboeck M *et al* (2006) The effects of GSTM1 and GSTT1 polymorphisms on micronucleus frequencies in human lymphocytes in vivo. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev*. 15:1038–1042.
- Lahiri DK and Nurnberger JI, Jr. (1991) A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 19:5444.
- Liu YJ, Huang PL, Chang YF, Chen YH, Chiou YH, Xu ZL, Wong RH (2006) GSTP1 genetic polymorphism is associated with a higher risk of DNA damage in pesticide-exposed fruit growers, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev*. 15:659–666.
- Majer BJ, Laky B, Knasmüller S, Kassie F (2001) Use of the micronucleus assay with exfoliated epithelial cells as a biomarker for monitoring individuals at elevated risk of genetic damage and in chemoprevention trials. *Mutat. Res*. 489:147–172.
- Maroni M, Fanetti AC and Metruccio F (2006) Risk assessment and management of occupational exposure to pesticides in agriculture. *Med Lav* 97:430-437.

- Mauro MYC, Muzi CD, Guimarães RM e Mauro CCC (2004) Riscos ocupacionais em saúde. *Revista de Enfermagem UERJ* 12:338-45.
- McIlwain CC, Townsend DM, Tew KD (2006) Glutathione S-transferase polymorphisms: cancer incidence and therapy. *Oncogene* 25:1639-48.
- Norppa, H. (1997) Cytogenetic markers of susceptibility: influence of polymorphic carcinogen-metabolizing enzymes. *Environ. Health Perspect.* 105:829–835
- Norppa H (2004) Cytogenetic biomarkers and genetic polymorphisms. *Toxicol Lett* 149:309-334.
- Précourt LP, Amre D, Denis MC, Lavoie JC, Delvin E, Seidman E, Levy E (2011) The three-gene paraoxonase family: physiologic roles, actions and regulation *Atherosclerosis* 214:20-36.
- Rohr P, da Silva J, Erdtmann B, Saffi J, Guecheva TN, Antônio Pêgas Henriques J, Kvitko K (2011) BER gene polymorphisms (OGG1 Ser326Cys and XRCC1 Arg194Trp) and modulation of DNA damage due to pesticides exposure. *Environ Mol Mutagen.* 52:20-7
- Rossini A, Rapozo DCM, Amorim LMF, Macedo JMB, Medina R, Neto JFN, Gallo CVM, Pinto LRF (2002) Frequencies of GSTM1, GSTT1, and GSTP1 polymorphisms in a Brazilian population. *Genet. Mol. Res.*, 1:233–240.
- Sieben A. e Machado C.A (2006) Histórico e contextualização sócio-econômica e ambiental da soja (*Glycine max*) no Brasil. *Revista Eletrônica do Curso de Geografia do Campus de Jataí – UFG* nº 7.
- Silins I e Hogberg J (2011) Combined toxic exposures and human health: biomarkers of exposure and effect. *Int J Environ Res Public Health* 8:629-647.
- Silva J, Freitas TRO, Marinho JR, Speit G, Erdtmann B. (2000) An Alkaline single-cell gel electrophoresis (comet) assay for environmental biomonitoring with native rodents. *Genetics and Molecular Biology* 23:241-245.
- Singh NP, Maccoby MT, Tice RR, Schneider EL (1988) A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental cell Research* 175:184-191.
- Singh S, Kumar V, Thakur S, Banerjee BD, Chandna S, Rautela RS, Grover SS, Rawat DS, Pasha ST, Jain SK *et al.* (2010) DNA damage and cholinesterase activity in occupational workers exposed to pesticides. *Environ Toxicol Pharmacol* 31:278-285.

- Singh S, Kumar V, Singh P, Thakur S, Banerjee BD, Rautela RS, Grover SS, Rawat DS, Pasha ST, Jain SK, Rai A (2011) Genetic polymorphisms of GSTM1, GSTT1 and GSTP1 and susceptibility to DNA damage in workers occupationally exposed to organophosphate pesticides. *Mutat Res.* 725:36-42
- Singh S, Kumar V, Thakur S, Banerjee BD, Rautela RS, Grover SS, Rawat DS, Pasha ST, Jain SK, Ichhpujani RL *et al.* (2011) Paraoxonase-1 genetic polymorphisms and susceptibility to DNA damage in workers occupationally exposed to organophosphate pesticides. *Toxicol Appl Pharmacol* 252:130-137.
- Sundberg K, Johansson AS, Stenberg G, Widersten M, Seidel A, Mannervik B, Jernström B (1998) Differences in the catalytic efficiencies of allelic variants of glutathione transferase P1-1 towards carcinogenic diol epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Carcinogenesis.* 19:433-6.
- Valverde M and Rojas E (2009) Environmental and occupational biomonitoring using the Comet assay. *Mutat Res* 681:93-109.
- van Delft JHM, Marie-Jose STS, van Asten JG, Vogel Nde, Bruijntjes-Rozier, TCDM, Schouten TC, Patricia C, Mass L, Marcel HVH (2001) Biological monitoring the exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons of Coke Oven workers in relation to smoking and genetic polymorphisms for GSTM1 and GSTT1. *Ann. Occup. Hyg.* 45:395–408.
- Villarini M, Moretti M, Fatigoni C, Agea E, Dominici L, Mattioli A, Volpi R, Pasquini R (2008) Evaluation of primary DNA damage, cytogenetic biomarkers and genetic polymorphisms for CYP1A1 and GSTM1 in road tunnel construction workers. *J. Toxicol. Environ. Health* 71:1430–1439.
- Watson MA, Stewart RK, Smith GB, Massey TE, Bell DA. (1988) Human glutathione S-transferase P1 polymorphisms: relationship to lung tissue enzyme activity and population frequency distribution. *Carcinogenesis* 19:275-80.
- Wong RH, Chang SY, Ho SW, Huang PL, Liu YJ, Chen YC, Yeh YH, Lee HS (2008) Polymorphisms in metabolic GSTP1 and DNA-repair XRCC1 genes with an increased risk of DNA damage in pesticide-exposed fruit growers, *Mutat. Res.* 654:68–75.

Wu X, Shi H, Jiang H, Kemp B, Hong WK, Delclos GL and Spitz MR (1997) Association between cytochrome P4502E1 genotype, mutagen sensibility, cigarette smoking and susceptibility to lung cancer. *Carcinogenesis* 18:967–973.

Embrapa - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária,

<http://www.cnpso.embrapa.br/producaosoja/SojanoBrasil.htm> (3 de novembro, 2011)

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e estatística,

<http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1>(5 de março de 2011)

Tabelas

Tabela 1: Características dos indivíduos avaliados pelo teste de micronúcleos e pelo ensaio cometa.

	Não expostos	Expostos
Nº de indivíduos	89	77
Idade^a	43,94 ± 13,87	47,71 ± 9,99
Gênero	32 homens, 57 mulheres	68 homens, 9 mulheres

^a média de anos ± desvio padrão.

Tabela 2: Frequências genotípicas e alélicas (em negrito) dos genes *PON1*, *GSTP1*, *GSTT1* e *GSTM1* nos indivíduos expostos e não expostos.

		Não expostos (%)	Expostos (%)	p^a
PON1	<i>Gln/Gln</i>	58 (62)	64 (74)	0,137
	<i>Arg/Gln</i>	29 (31)	14 (16)	
	<i>Arg/Arg</i>	7 (7)	9 (10)	
	PON1 192Arg	0,28	0,18	
GSTP1	<i>Ile/Ile</i>	36 (38)	38 (45)	0,366
	<i>Val/Ile</i>	47 (51)	41 (49)	
	<i>Val/Val</i>	10 (11)	5 (6)	
	GSTP1 105Val	0,36	0,3	
GSTT1	<i>nulo</i>	17 (18)	14 (18)	
	<i>não-nulo</i>	75 (82)	64 (82)	
GSTM1	<i>nulo</i>	53 (58)	44 (57)	
	<i>não-nulo</i>	39 (42)	33 (43)	

p^a - valor calculado pelo teste de Fisher.

Tabela 3: Valores obtidos pelos biomarcadores de exposição e de efeito nos indivíduos expostos e não expostos - média ± desvio padrão (número de indivíduos).

	Não exposto	Exposto
Índice de dano (ID)	11,62 ± 11,28 (89)	38,97 ± 20,0 (72)*
Frequência de dano (FD)	7,74 ± 7,32 (89)	23,46 ± 9,54 (72)*
Frequência de micronúcleo (MN)	0,92 ± 1,17 (87)	3,1 ± 2,44 (77)*

* Significante em relação ao grupo não exposto. P<0,01 Mann-Whitney U.

Tabela 4: Efeito dos genótipos nos biomarcadores avaliados em indivíduos expostos e não expostos.

Genótipos		Não expostos	Expostos
MN (2000 células/indivíduo)			
PON1	<i>Gln/Gln</i>	1,04 ± 1,23 (51)	3,38 ± 2,44 (58)
	<i>Arg/-</i>	0,71 ± 1,07 (35)	2,26 ± 2,26 (19)
GSTP1	<i>Ile/Ile</i>	0,74 ± 0,99 (31)	3,52 ± 2,63 (33)
	<i>Val/-</i>	0,93 ± 1,15 (54)	2,83 ± 2,31 (41)
GSTT1	<i>nulo</i>	0,56 ± 1,03 (16)	3,15 ± 1,62 (13)
	<i>não-nulo</i>	0,96 ± 1,18 (69)	3,13 ± 2,62 (61)
GSTM1	<i>nulo</i>	0,71 ± 1,13 (49)	3,22 ± 2,45 (41)
	<i>não-nulo</i>	1,11 ± 1,16 (36)	2,84 ± 2,31 (32)
ID (100 células/indivíduo)			
PON1	<i>Gln/Gln</i>	12,98 ± 12,09 (55)	39,23 ± 20,28 (52)
	<i>Arg/-</i>	9,25 ± 9,48 (32)	38,30 ± 19,76 (20)
GSTP1	<i>Ile/Ile</i>	11,65 ± 10,70 (34)	37,29 ± 15,35 (31)
	<i>Val/-</i>	11,42 ± 11,81 (52)	40,48 ± 23,26 (40)
GSTT1	<i>nulo</i>	10,44 ± 12,84 (16)	46,77 ± 22,96 (13)
	<i>não-nulo</i>	11,58 ± 11,00 (69)	36,37 ± 17,69 (52)
GSTM1	<i>nulo</i>	10,93 ± 11,42 (51)	38,38 ± 21,62 (37)
	<i>não-nulo</i>	11,03 ± 11,23 (34)	38,54 ± 15,61 (28)
FD (100 células/indivíduo)			
PON1	<i>Gln/Gln</i>	8,56 ± 7,94 (55)	23,81 ± 9,79 (52)
	<i>Arg/-</i>	6,41 ± 6,11 (32)	22,55 ± 9,04 (20)
GSTP1	<i>Ile/Ile</i>	7,88 ± 6,74 (34)	22,71 ± 7,39 (31)
	<i>Val/-</i>	7,58 ± 7,82 (52)	24,15 ± 11,06 (40)
GSTT1	<i>nulo</i>	7,38 ± 8,39 (16)	27,23 ± 11,73 (13)
	<i>não-nulo</i>	7,65 ± 7,16 (69)	22,62 ± 8,71 (52)
GSTM1	<i>nulo</i>	7,78 ± 7,75 (51)	23,03 ± 11,47 (37)
	<i>não-nulo</i>	7,32 ± 6,82 (34)	24,21 ± 8,09 (28)

Teste t de Student - média ± desvio padrão (número de indivíduos).