


Universidade Federal do Rio Grande do Sul



**RISCO OCUPACIONAL EM FUMICULTORES:
GENOTOXICIDADE ASSOCIADA À
SUSCETIBILIDADE GENÉTICA**

Fernanda Rabaioli da Silva

Orientadora: Profa. Dra. Kátia Kvitko

Co-orientadora: Profa. Dra. Juliana da Silva

Porto Alegre (RS)

Outubro, 2011

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

**RISCO OCUPACIONAL EM FUMICULTORES:
GENOTOXICIDADE ASSOCIADA À SUSCETIBILIDADE GENÉTICA**

Fernanda Rabaioli da Silva

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutora em Ciências (Genética e Biologia Molecular)

Orientadora: Profa. Dra. Kátia Kvitko
Co-orientadora: Profa. Dra. Juliana da Silva

Porto Alegre (RS)

Outubro de 2011

Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Imunogenética do Departamento de Genética do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) em colaboração com o Laboratório de Implantação Iônica do Instituto de Física da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), com o Laboratório de Genética Toxicológica e Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Veterinário da Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), com o Laboratório de Estresse Oxidativo e Antioxidante do Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul (UCS), com o Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas do Instituto de Toxicologia da Pontífice Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) e subvencionado pela: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes).

Dedico este trabalho a aqueles que mais se dedicaram a mim: a minha família, ao meu amor e em especial ao meu amado e saudoso pai, o maior incentivador de minhas escolhas e admirador de minhas conquistas.

AGRADECIMENTOS

Pela vida, construímos uma porção de propostas, sem mesmo nos darmos conta. Vamos tendo desejos, objetivos, metas. Buscamos por realizações, encontramos o que desejávamos, nos frustramos quando os sonhos não se tornam realidade. Assim, vamos fazendo nossa história. Ensinam-nos muitas coisas, outras vamos descobrindo sozinhos, às vezes “a trancos e barrancos”. Viver é uma arte, e uma arte inacabada, trabalhada no dia a dia, uma arte que necessita a ferramenta do relacionar-se... relacionar-se com os outros e consigo mesma. Eu, ao longo destes anos, tive o privilégio de relacionar-me com muitos professores, pesquisadores, colegas, agricultores... Tive experiências pessoais essenciais para a construção da minha personalidade, sobre minha forma de pensar e agir, experiências através da convivência nos laboratórios, nas coletas, nas salas de aula, nos corredores da universidade, no RU... O que me leva a pensar que entre o observado e o esperado há um universo de possibilidades, mas acima de tudo da troca de experiências pessoais. Sendo assim, este trabalho foi sonhado por mim, mas realizado por muitos.

Agradeço,

À minha mãe, ao meu pai e ao meu irmão que sempre me incentivaram, acreditando em meu esforço. Agradeço pela compreensão e dedicação, fatores indispensáveis para que este trabalho fosse gerado; e principalmente pelo amor, fator indispensável na minha vida;

Ao amor que encontrei durante esse doutorado, o Thiago, meu melhor amigo, meu maior parceiro e incentivador;

À Liane, ao Luciano e à Dai, que fazem parte da minha família agora. Agradeço o carinho, respeito e apoio;

À minha orientadora Kátia Kvitko, pela amizade, confiança, dedicação e serenidade com a qual tantas vezes transformou minhas dúvidas em certezas;

À minha co-orientadora Juliana da Silva pela amizade, carinho e compreensão despendidos durante toda graduação, mestrado e doutorado, apoiando-me em todas as decisões e dificuldades. Agradeço a oportunidade de trabalhar ao seu lado durante todos estes anos;

Ao Seu Vicente da Emater e ao Seu Elo do sindicato por toda assistência nas coletas realizadas nas lavouras de fumo;

Aos professores (as) Mariangela da Costa Algayer, Johnny Ferraz Dias, Mirian Salvador e Flávia Valladão Thiesen pela colaboração nesta pesquisa;

Aos demais professores, pela formação acadêmica, pela compreensão e pelo conhecimento dado a mim durante as disciplinas da pós-graduação e em especial ao Zeca;

Aos colegas e amigos de Laboratório de Toxicologia da ULBRA: Aline, Pedro, Val, Sebastião, Ju Semedo, Ju Reyes, Ricardo, Letícia, Nânci, Lê, Rô, Meri, Marisa, Débora e em especial ao Martus, Vini e Vivian pelo apoio nas coletas e à Mila, a Vivian (de novo) e a Dani pela ajuda nas lâminas. A todos agradeço o apoio, carinho, amizade e parceria;

Aos colegas de outros laboratórios: Marina, Caroline, Carla e Cátia pela ajuda;

Aos amigos e colegas do Laboratório de Imunogenética: Bruno Preto e Bruno Branco, Camila, Camile, Cadu, Cíntia, Dinler, Fezis, Francis, Gabi, Gui, Gustavo, Bel, Jacque, Ju, Marialva, Maurício M, Dine, Pedro, Pietra, Pri, Samuel, Simone, Tiago Veit, Tiago Dalberto, Natália, Maurício B, Gabriel pela convivência, pelas conversas e pelo apoio. Em especial a Nayê e a Paula. À Nayê pela ajuda dada com os PCRs, pela parceria em Congressos e pelo companheirismo. À Paula, por tanta coisa: por ter-me “aceito”, pela ajuda com os polimorfismos, por ter sido minha motorista e animadora nas coletas, pelos desabafos, pelas risadas, pelas discussões, pela paciência com minhas dúvidas, esquecimentos e confusões, enfim... valeu mesmo;

A todas as minhas grandes amigas, por compartilharmos as alegrias e por enfrentarem junto comigo as dificuldades, entre elas Gi, Raquel, Pô, Ju, Vany, Fabi e Quel. E aos novos amigos que fui fazendo durante estes anos, ao pessoal do Cenáculo, ao pessoal do Albergue, ao pessoal do samba;

Ao Elmo pelo respeito, carinho e auxílio nas "burocracias";

A toda minha família: tios, primos, avós e cunhada, pelo apoio e carinho;

Aos agricultores, por nos colocarem dentro de suas casas e nos permitirem realizar esse trabalho: meu carinho e meu respeito.

A todas as pessoas, cujos nomes não são citados, mas que de alguma forma contribuíram direta ou indiretamente na realização deste trabalho.

A Deus, por colocar estas pessoas em minha vida!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	04
LISTA DE SÍMBOLOS	06
LISTA DE UNIDADES	07
LISTA DE FIGURAS	08
LISTA DE TABELAS	09
RESUMO	11
ABSTRACT	13
CAPÍTULO I	15
I.1 INTRODUÇÃO	15
<i>I.1.1. AGROQUÍMICOS</i>	16
<i>I.1.2. PESTICIDA NATURAL: NICOTINA</i>	23
<i>I.1.3 AVALIAÇÃO DO RISCO OCUPACIONAL E O USO DE BIOMARCADORES</i>	28
I.2 OBJETIVOS	34
CAPÍTULO II	35
OCCUPATIONAL RISK IN TOBACCO FARMERS: GENOTOXIC ASSESSMENT AT DIFFERENT CROP TIMES	35
CAPÍTULO III	63
BUCCAL MICRONUCLEUS CYTOME ASSAY AND GENETIC POLYMORPHISM FOR <i>PON1</i> AND <i>CYP2A6*9</i> IN BIOMONITORING WITH TOBACCO FARMERS	63
CAPÍTULO IV	92
GENOTOXIC BIOMONITORING STUDY OF TOBACCO FARMERS: BIOMARKERS OF EXPOSURE, OF EARLY BIOLOGICAL EFFECTS AND OF SUSCEPTIBILITY	92
CAPÍTULO V	129
V.1 DISCUSSÃO	129
V.2 CONCLUSÃO	146
CAPÍTULO VI	148
VI.1 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS (CAPÍTULO I E V)	148
ANEXOS	161
TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO	161
QUESTIONÁRIO PESSOAL	164
CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UFRGS	166

LISTA DE ABREVIATURAS

AChe: acetilcolinesterase

ALT: alanina aminotransferase

Arg: arginina

AST: aspartato aminotransferase

BChe: butirilcolinesterase

BER: reparo por excisão de bases

BMNCyt assay: “cytome” ensaio de micronúcleo de célula bucal

BN: células binucleadas

C: citosina

CAT: catalase

CBMN test: teste de MN em linfócitos humano por bloqueio da citocinese

Che: colinesterase

CHO: células de ovário de hamster chinês

CL50: concentração letal de 50%

CK: creatina quinase

CYP2A6: citocromo P450 2A6

Cys: cisteína

DF/FD: “damage frequency”/frequência de dano

DI/ID: “damage index”/índice de dano

DL50: dose letal de 50%

DMSO: dimetil sulfóxido

DNA: ácido desoxirribonucléico

DSB: quebra de fita dupla

EC: ensaio Cometa

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

G: guanina

Gln: glutamina

GST: glutathione S-transferase

GTS: “green tobacco sickness”

HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência

HRR: reparo por recombinação homóloga
i.e: isto é
Ile: isoleucina
IR: radiação ionizante
LDH: lactato desidrogenase
MN: micronúcleo
NBUD: broto nuclear
NHEJ: reparo por recombinação não homóloga
NPB: ponte nucleoplasmática
OGG1: 8-oxoguanina DNA glicosilase
O-oxoG: oxo-7,8-dihydroguanina
PARP: poli-ADP-ribose polimerase
PCR: reação em cadeia da polimerase
PIXE: emissão de partículas por raios-X
PON: paraoxonase
PPE/EPI: “protective measure adopted”/equipamento de proteção individual
RFLP: polimorfismo do tamanho do fragmento de restrição
ROS/ERO: “reactive oxygen species”/espécie reativa de oxigênio
SCE: trocas entre cromátides irmãs
S.D.: “standard deviation”
Ser: serina
SOD: superóxido dismutase
SSB: quebra de fita simples
SVS/MS: secretaria de vigilância sanitária do Ministério da Saúde
T: timina
TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
Thr: treonina
Trp: triptofano
UV: radiação ultravioleta
5'-UTR: “5'-untranslated region”

LISTA DE SÍMBOLOS

$t^{1/2}$: tempo de meia-vida

°C: grau Celsius

β : beta

pH: potencial hidrogeniônico

%: por cento

Ca: cálcio

Cr: cromo

Cd: cádmio

Fe: ferro

Na: sódio

Mg: magnésio

P: fósforo

S: enxofre

Cl: cloro

K: potássio

Ti: titânio

Zn: zinco

Cu: cobre

Al: alumínio

Mn: manganês

Co: cobalto

Ni: níquel

Ge: germânio

K_w : constante de ionização da água

LISTA DE UNIDADES

μg : micrograma

mg: miligrama

kg: quilograma

ng: nanograma

g/mol: grama por mol

μl : microlitro

ml: mililitros

l: litro

mm: milímetros

h: horas

eV: elétron-volt

keV: mil elétron-volt

MeV: 1 milhão de elétron-volt

V: volts

ppm: partes por milhão

mM: milimolar

M: molar

mbar: milibar

nA: nanoampere

mA: miliampere

nm: nanômetro

v/v: volume por volume

w/v: peso por volume

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I	15
Figura 1: Família de agricultores envolvida na safra do fumo do município de Venâncio Aires-RS	16
Figura 2: Ciclo vegetativo e principais agroquímicos comumente empregados na cultura do tabaco	19
Figura 3: Cultivo do tabaco: a) capação, b) aplicação de veneno, c) colheita, d e e) mãos dos trabalhadores, f) maços carregados	26
Figura 4: Modelo do biocomportamento da GTS	27
CAPÍTULO II	35
Figure 1: Distribution of damaged cells in Comet assay into damaged classes (grade 0–4) at different exposure phases of the tobacco farmers and the non-exposed group	57
Figure 2: Correlation of the DNA damage with exposure time (A) and age (B); and correlation of MN frequency with exposure time (C) and age (D)	58
Figure 3: Mean and standard deviation of A) damage index and B) MN frequency of individuals using non-complete and complete personal protective equipment	59
Figure 4: Concentrations of cotinine (ng/ml) in the serum blood samples of tobacco farmers and non-exposed individuals	60
Figure 5: Concentrations of cholinesterase (UL ⁻¹) in the serum blood samples of tobacco farmers and non-exposed individuals	61
Figure 6: Vegetative cycle and mains agrochemicals used in greenhouse tobacco crop in Brazil	62
CAPÍTULO III	63
Figure 1: Concentrations of cotinine (ng/ml) in the serum blood samples of tobacco farmers and non-exposed individuals	89
Figure 2: Concentrations of cholinesterase (UL ⁻¹) in the serum blood samples of tobacco farmers and non-exposed individuals	90
Figure 3: Effect of the <i>PON1 Gln192Arg</i> and <i>CYP2A6*9 (-48T>G)</i> genotypes on the level of A) cholinesterase and B) cotinine biomarkers in the exposed group (pesticide application and leaf harvest groups)	91
CAPÍTULO IV	92

Figure 1: Correlation of the CBMN assay results with age (A) non-exposed group (B) pesticide application group 122

Figure 2: Mean and standard deviation of MN, NBUD and NPB frequency of individuals that no use or non-complete and complete personal protective equipment use in pesticide application group 123

Figure 3: Results of oxidative stress markers analyzed in non-exposed and exposed groups 128

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I	15
Tabela 1: Classificação e recomendação dos agrotóxicos	17
Tabela 2: Principais agrotóxicos recomendados para a cultura do fumo	20
CAPÍTULO II	35
Table 1: Demographic characteristics of the study population with respect to sex, age, smoking and years of exposure	55
Table 2: Mean values (mean \pm standard deviation) obtained by the genotoxicity and mutagenic parameters analyzed	56
CAPÍTULO III	63
Table I: Evaluation of genetic damage in tobacco farmers: main demographic characteristics of the studied subjects	84
Table II: Buccal micronucleus cytome assay results for cells collected from non-exposed and exposed groups	85
Table III: <i>PON1 Gln192Arg</i> and <i>CYP2A6*9</i> (-48T>G) genotypes distribution and variant alleles frequencies in non-exposed and exposed groups	86
Table IV: Effect of the <i>PON1 Gln192Arg</i> and <i>CYP2A6*9</i> (-48T>G) genotypes on the buccal micronucleus cytome assay results in non-exposed and exposed groups	87
CAPÍTULO IV	92
Table I: Evaluation of genetic damage in tobacco farmers: main demographic characteristics of the studied subjects	120
Table II: Mean values (mean \pm SD) obtained with the cytogenetic analysis in non-exposed and exposed groups	121
Table III: Genotypes distribution and variant alleles frequencies in subjects studied ..	124
Table IV: Effect of individual genotype of the metabolism genes on the level of different biomarkers evaluated in control and exposed group (mean \pm SD)	125
Table V: Effect of individual genotype of the DNA repair genes on the level of different biomarkers evaluated in control and exposed group (mean \pm SD)	126
Table VI: Content of trace elements (ppm) in the blood samples of the non-exposed and exposed groups (mean \pm S.D)	127

RESUMO

Agricultores envolvidos no cultivo do tabaco estão constantemente expostos a uma grande variedade de químicos. O uso de agrotóxicos em larga escala tem provocado danos à saúde destes trabalhadores assim como a manipulação das folhas de fumo úmidas, pois além de substâncias antropogênicas persistentes outros compostos orgânicos com potencial pesticida estão presentes nas folhas do tabaco. A nicotina, através do contato dermal com as folhas do fumo, tem causado um envenenamento agudo nos trabalhadores da lavoura. O conjunto de sintomas desta exposição é conhecido como doença da folha verde. Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito genotóxico em fumicultores expostos ocupacionalmente a agrotóxicos e nicotina. A instabilidade genômica, a morte celular, a dosagem de colinesterase, cotinina e marcadores de estresse oxidativo bem como o conteúdo de elementos traço foram analisados nas células destes trabalhadores. Para verificar a possível modulação de genes de suscetibilidade com os resultados dos biomarcadores, os polimorfismos dos genes *GSTT1*, *GSTM1*, *GSTP1*, *CYP2A6*, *PON*, *OGG1*, *RAD51*, *XRCC1* e *XRCC4* foram avaliados. No primeiro momento, amostras de sangue periférico foram coletadas de 30 indivíduos expostos e de 30 indivíduos não expostos com o intuito de investigar o risco ocupacional em três diferentes períodos da safra de fumo (entresafra, aplicação intensa de pesticidas e na colheita da folha). Neste estudo foi observado aumento significativo de dano ao DNA, avaliado pelo ensaio Cometa, em fumicultores comparados ao grupo não exposto em todos os períodos da safra e, um significativo aumento na frequência de células micronucleadas na entresafra. Correlação entre idade e tempo de exposição em relação aos resultados do ensaio Cometa e do teste de MN não foi encontrado. O dano ao DNA foi maior em homens comparado a mulheres, mas diferença significativa foi observada apenas na entresafra. Não houve diferença na atividade da colinesterase entre os grupos estudados. Elevado nível de cotinina foi observado na colheita da folha de fumo, demonstrando exposição à nicotina. Em um segundo momento, amostras de sangue periférico e de mucosa oral foram coletadas de aproximadamente 111 agricultores em dois períodos da safra (na aplicação intensa de pesticidas e na colheita) e de 56 indivíduos não expostos. Os resultados destes testes demonstraram anomalias nucleares nas células de fumicultores expostas a misturas de substâncias com potencial genotóxico e citotóxico. Diferença nos resultados foi percebida

entre os dois momentos da safra de fumo investigados. Modulação no dano ao DNA e na morte celular em células da mucosa oral foi observada nos genes *PON1* e *CYP2A6*. Diferença entre gênero e tempo de exposição não foi encontrada nos diferentes parâmetros analisados. Houve correlação entre idade e os resultados obtidos no teste de MN em linfócitos no grupo não exposto e no momento da aplicação de pesticidas. Em relação ao uso do equipamento de proteção individual, diferença na frequência de MN no momento da aplicação de pesticidas foi observada. Dos nove marcadores de suscetibilidade estudados, somente *GSTM1* nulo e *CYP2A6*9*, demonstraram associação com os resultados obtidos pelo teste de MN em linfócitos. Diferença na atividade da colinesterase e nos níveis de cotinina não foi observada em relação aos diferentes genótipos de *PON1* e de *CYP2A6*, respectivamente. Aumento de cromo, magnésio, alumínio, cloro, zinco e potássio foram percebidos no momento da aplicação de pesticidas em relação ao grupo não exposto e à colheita. Maior atividade da superóxido dismutase no grupo exposto em relação ao grupo não exposto foi observada. Atividade da catalase e a medida de TBARS apresentaram aumento significativo na colheita da folha de fumo em relação ao grupo não exposto e ao momento da aplicação de pesticidas. Finalmente, esta investigação sugere níveis maiores de dano ao DNA avaliados pelo ensaio Cometa e pelo teste de MN em linfócito e em mucosa oral, nos diferentes momentos da safra do fumo (aplicação de pesticidas e colheita), chamando a atenção o significativo aumento de dano ao DNA no momento da entressafra. Modulação dos genes de metabolismo foi observada, onde *GSTM1* nulo e *PON1 Gln/Gln* tiveram maiores níveis de dano ao DNA, em linfócitos e em células da mucosa oral respectivamente, no momento da aplicação de pesticidas e *CYP2A6*1/*1* e *CYP2A6*9/-* tiveram maiores níveis de dano ao DNA (em linfócitos) e de morte celular (em células da mucosa oral) na colheita. Não houve influência dos genes envolvidos no reparo em relação aos diferentes biomarcadores no grupo exposto. Os resultados indicam que exposição crônica a pesticidas, tanto químicos sintéticos como natural, pode ativar o sistema de enzimas antioxidantes. Por fim, nosso estudo chama a atenção à necessidade de formação profissional e informação sobre práticas seguras no uso de pesticidas e, além disso, na fumicultura, na manipulação das folhas fumo.

ABSTRACT

Agricultural workers engaged in tobacco cultivation are constantly exposed to large amounts of pesticides as well as to the nicotine present in raw tobacco leaves. Pesticides have been considered potential chemical mutagens. Studies have assumed that nicotine absorbed through the skin results in the characteristic green tobacco sickness (GTS), an occupational illness reported by tobacco workers. This study sought to determine genotoxic effects in farm workers occupationally exposed to agrochemicals and nicotine. The genomic instability, cell death as well as cholinesterase and cotinine levels in the blood of tobacco farmers were investigated. In order to verify relation of genetic susceptibility with biomarkers results, *GSTT1*, *GSTM1*, *GSTP1*, *CYP2A6*, *PON*, *OGG1*, *RAD51*, *XRCC1* and *XRCC4* genes polymorphisms was evaluated. Determination of oxidative stress markers and trace elements content was accomplished. In the first moment, peripheral blood samples were collected from 30 agricultural workers and 30 non-exposed subjects to investigate occupational exposure in three different crop times (off-season, during pesticides application and leaf harvest). In this study a significant increase in DNA damage, assessed by Comet assay, was observed in tobacco farmers compared to the non-exposed group, for all different crop times, and a significant increase in micronucleated cells was detected in the off-season group. No correlation was found between age and exposure time in relation to biomarker tests. The DNA damage was greater in males than in females, but with a significant difference only in off-season group. No difference, in cholinesterase activity, was seen among the group of farmers and non-exposed group. Increased level of cotinine was observed in leaf harvest group. In the second moment, peripheral blood and buccal cells samples were collected about from 111 agricultural workers, at two different crop times (during pesticides application and leaf harvest), and 56 non-exposed individuals. Results showed nuclear anomalies in the blood and buccal cells in tobacco farmers exposed to mixture of the substances with genotoxic and cytotoxic potential. Difference in blood and buccal micronucleus cytome assay results was found among two different times in the tobacco crop. Effects of *PON1* and *CYP2A6* genetic polymorphisms on the modulation of DNA damage induced by pesticides and cell death were observed in buccal micronucleus cytome (BMNcyt) assay. No statistically significant difference was found between genders and exposure time for all parameters analyzed. No

difference was observed in hematocrit values between the groups. Correlation was observed in age and cytokinesis-blocked micronuclei (CBMN) assay results in non-exposed and pesticide application group. In relation to personal protective equipment (PPE) use, increased MN frequency in pesticide application was observed. From the nine markers of individual susceptibility studied in the CBMN assay, only *GSTM1* null and *CYP2A6*9*, showed significant associations with results in farmers cells. Increase in cotinine level was observed in leaf harvest, when compared to non-exposed group. Cholinesterase (BChe) level was similar in the farmer and non-exposed group. No significant effect on the BChE activity and cotinine level was observed in exposed group with reference to different *PON1* and *CYP2A6* genotypes, respectively. In pesticide application was found increase in chromium, magnesium, aluminum, chloride, zinc and potassium, when compared to non-exposed and leaf harvest group. Superoxide dismutase (SOD) activity presented a significant increase in exposed groups (pesticide application and leaf harvest) in relation to non-exposed group, and pesticide application presented higher values than leaf harvest group. The catalase (CAT) activity and TBARS presented a significant increase in leaf harvest than non-exposed group and pesticide application. Finally, this investigation suggests that DNA damage increases, analyzed by Comet, CBMN and BMNcyt assays, at different tobacco crop stages (pesticides application and tobacco leaf harvest), calling attention to the significant increase in the DNA damage during the off-season. Effect of individual genotype of the metabolism genes on the level of different biomarkers evaluated in exposed group demonstrated an influence on increase in damage of *GSTM1* null (blood cells) and *PON1 Gln/Gln* (buccal cells) on pesticides application group, and a influence of *CYP2A6*1/*1* (blood cells) and *CYP2A6*9/-* (buccal cells) on tobacco leaf harvest group. Individual genotype of the DNA repair genes of exposed groups did not show influence on the different biomarkers in this study. In pesticide application was found increase of trace elements content. The results also indicated that chronic exposure to pesticides, synthetic and natural, can influence antioxidant enzymes activity. Our study drives the attention once more to the need for occupational training on safe working practices and safe work environment for farm workers. Developing countries should use such data to establish safety occupational rules during the use of pesticides and mainly during tobacco leaf harvest.

CAPÍTULO I

I.1 INTRODUÇÃO

A origem do fumo permanece obscura à luz da pesquisa e da história (Schoenhals *et al.*, 2009). Segundo Sefrini (1995) Cristóvão Colombo testemunhou o hábito de fumar folhas de tabaco, evidenciando que a história do fumo na América começou bem antes da chegada dos europeus. A hipótese mais provável é que a planta tenha surgido nos vales orientais dos Andes bolivianos, difundindo-se pelo território brasileiro, através das migrações indígenas, sobretudo dos tupis-guaranis.

Atualmente, o Brasil produz mais de 850 mil toneladas de tabaco por ano, sendo o segundo maior produtor e o maior exportador mundial (IBGE, 2011). O setor fumageiro exerce grande importância na atividade econômica e social do país. Na área econômica, o fumo é responsável pela arrecadação de grandes somas em impostos. No campo social, a atividade fumageira é grande geradora de empregos, envolvendo em média a mão-de-obra de mais de 1.050.000 agricultores. Além disso, as usinas de beneficiamento e as fábricas de cigarros empregam mais de 40.000 pessoas. No total, considerando a soma dos empregos diretos e indiretos gerados pelo fumo desde o seu plantio até a comercialização do cigarro, há o envolvimento de aproximadamente 2,5 milhões de pessoas que de alguma forma estão vinculadas ao setor (AFUBRA, 2011).

A cultura do fumo é desenvolvida em 733 municípios dos três Estados do Sul, dos quais 484 são gaúchos (INCA, 2011). Na safra atual estão envolvidas cerca de 200.000 famílias de agricultores (Figura 1) que possuem, em média, propriedades inferiores a 18 hectares. Estas propriedades se caracterizam pelo uso massivo de agrotóxicos (AFUBRA, 2011). Embora o setor fumageiro tenha importância na economia do país, a fumicultura tem sido questionada quanto às reais possibilidades de promover melhorias na qualidade de vida dos trabalhadores, principalmente devido ao uso excessivo de agrotóxicos, ao grande esforço físico exigido no manejo da cultura, especialmente no período de colheita, e à elevada demanda de mão de obra em determinadas épocas do ano, pois o ciclo produtivo dura cerca de 10 meses (Agostinetto *et al.*, 2000). Os fumicultores estão continuamente sofrendo exposição ocupacional por um conjunto de compostos. Entre os inseticidas e acaricidas mais utilizados estão os organofosforados, altamente tóxicos. Etges *et al.* (2002)

apontam, além dos organofosforados como agentes de intoxicação, também o manganês e a nicotina. A nicotina (pesticida natural da planta) quando em contato com o tecido dermal do trabalhador causa um conjunto de sintomas conhecido como “green tobacco sickness” (GTS) ou doença da folha verde (Arcury *et al.*, 2003).



Figura 1: Família de agricultores envolvida na safra do fumo do município de Venâncio Aires-RS.

I.1.1 AGROQUÍMICOS

Os termos agroquímicos, pesticidas, praguicidas, biocidas, fitossanitários, defensivos agrícolas, venenos e remédios são terminologias utilizadas para um mesmo grupo de substâncias químicas: “agrotóxico” (Domingues *et al.*, 2004; Faria *et al.*, 2007). Sendo assim, são consideradas substâncias ou misturas de substâncias usadas para prevenir ou controlar doenças de plantas, pestes e ervas daninhas (Gallo *et al.*, 2002; Bolognesi, 2003; Domingues *et al.*, 2004). Gallo *et al.* (2002) consideram ainda, como agrotóxico, agentes utilizados com a finalidade de dessecar ou desfolhar plantas, excluindo, entretanto, os fertilizantes ou agentes que atuam no processo de crescimento vegetativo.

No Brasil, o consumo de agrotóxicos cresceu bastante nas últimas décadas, transformando o país em um dos maiores consumidores mundiais, ocupando o quarto lugar no *ranking* dos países consumidores de agroquímicos. A compra de insumos agrícolas cresceu 4,3 vezes, passando de 28.043 toneladas para 121.100 toneladas/ano. Embora a

pesquisa brasileira sobre o impacto do uso de pesticidas sobre a saúde humana também tenha crescido nos últimos anos, ainda é insuficiente para conhecer a extensão da exposição ocupacional e a dimensão dos danos à saúde, decorrentes do uso intensivo destes produtos. Um dos problemas apontados é a falta de informações sobre o consumo e a insuficiência dos dados sobre intoxicações por agrotóxicos (Faria *et al.*, 2007).

O risco de uma substância química depende de dois fatores: a exposição e a toxicidade (Garcia e Alves Filho, 2005). A toxicidade dos agrotóxicos e de suas formulações comerciais é avaliada através de vários parâmetros, com normas e critérios rígidos, definidos por órgãos oficiais. Os estudos necessários a essa avaliação são: DL50 (Dose Letal para 50% de um lote de animais submetidos ao protocolo experimental) oral aguda; DL50 dérmica aguda; irritabilidade ocular; irritabilidade dérmica; sensibilização dérmica e CL50 (Concentração Letal) inalatória. A classificação toxicológica diz respeito exclusivamente a quem manuseia o produto em uma única exposição; é importante como medida de segurança para quem trabalha na produção, na embalagem, no armazenamento, no transporte, no preparo da calda e na sua aplicação. Esta classificação não está relacionada com exposição a longo prazo e com a segurança do ambiente (Stützer e Guimarães, 2003; Carvalho e Pivoto, 2011). A classificação toxicológica dos agrotóxicos no Brasil apresenta no rótulo cor correspondente a tal (Tabela 1).

Tabela 1. Classificação e recomendação dos agrotóxicos.

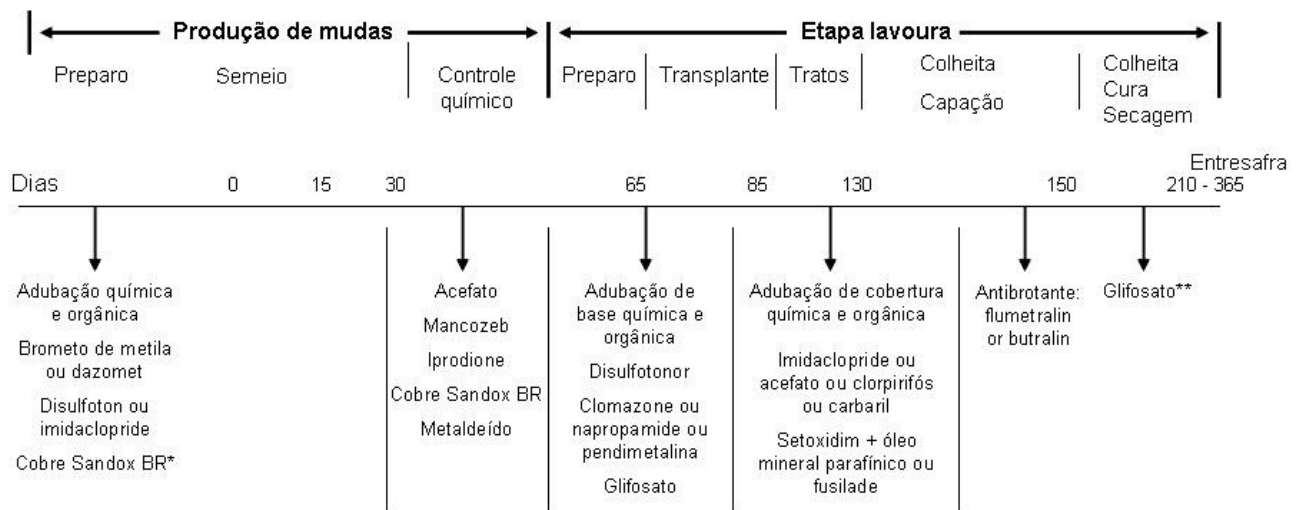
Classe	Faixa	Classificação do produto	Recomendação
I	Vermelha	Extremamente tóxico	Somente devem ser utilizados por operadores profissionais licenciados, que tenham conhecimento da química, usos, perigos e precauções no uso.
II	Amarela	Altamente tóxico	Devem ser utilizados por operadores que aplicam, seguindo estritas condições controladas, supervisionadas e treinadas.
III	Azul	Medianamente tóxico	Seus operadores devem observar as normas rotineiras de segurança na aplicação. Esta categoria inclui agrotóxicos altamente tóxicos e todos os que possuem efeitos adversos para o ambiente e aqueles cujo uso descontrolado não é desejável.
IV	Verde	Pouco tóxico (mas é tóxico)	Utilizados por operadores treinados que observem medidas de proteção rotineiras. Esta categoria inclui agrotóxicos comercialmente liberados, excluído o uso pelo público em geral.

Fonte AGROFIT (2011)

Em 1992, uma portaria da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde (Portaria SVS/MS Nº 3 de 16/01/92) (Ministério da Saúde, 2011) alterou as regras de classificação toxicológica, buscando se adequar aos padrões internacionais. Esta alteração reduziu a classificação de muitos produtos. Um exemplo foi o que ocorreu com o herbicida glifosato, da marca comercial *Roundup*[®], que antes era classe II e atualmente é classe IV. Esta mudança pode ter produzido entre os trabalhadores rurais (e entre alguns profissionais) a falsa impressão de que o produto tenha ficado "menos tóxico" apesar de ser idêntico a formulação anterior (Faria *et al.*, 2007).

A principal questão envolvendo a classificação toxicológica é que ela reflete basicamente a toxicidade aguda e não indica os riscos de doenças de evolução prolongada como, por exemplo, câncer, neuropatias, hepatopatias, problemas respiratórios crônicos e outros (Faria *et al.*, 2007). Existem classificações internacionais sobre riscos de câncer e de neurotoxicidade dos agrotóxicos (Larini, 1999), mas na prática, a classificação toxicológica é a única informação utilizada pelos trabalhadores rurais e pela maioria dos profissionais. Deve-se reconhecer que, apesar dos avanços científicos, há limites técnicos para as avaliações toxicológicas e ambientais que implicam em diversos graus de incertezas e insuficiência de informações, que não permitem uma análise de risco perfeitamente conclusiva (Garcia e Alves Filho, 2005).

O fumo requer grande quantidade de pesticidas para protegê-lo de insetos e doenças. A aplicação de agrotóxicos é a atividade de manejo da cultura que oferece maior perigo aos fumicultores e suas famílias, que se repete como num ritual, ano após ano (Figura 2). Nos mês de maio, inicia-se o preparo da sementeira com o uso de alguns agroquímicos pelo *sistema float* (sistema de mudas em bandejas). Usa-se, também, herbicida, inseticida e aplicam-se fungicidas (de contato ou sistêmico) de cinco a seis vezes neste sistema. O transplante das mudas é feito em agosto a setembro e, periodicamente, são aplicados inseticidas, nematicidas, acaricidas, fungicidas, entre outros, até o final do ciclo. De dezembro a fevereiro temos a fase da colheita da folha do fumo, onde, para evitar a floração e o excesso de brotos, usa-se antibrotante de uma a três vezes. A partir de fevereiro, inicia-se a fase de secagem, curagem e beneficiamento da folha de fumo e por fim, nos meses que seguem, a comercialização (Agostinetti *et al.*, 2000).



*Produto específico do sistema *float*

**Embora esse dessecante seja indicado para o uso em pré-plantio e pós-colheita, averigua-se o seu emprego antes do término da colheita, sobretudo em regiões altas.

Figura 2: Ciclo vegetativo e principais agroquímicos comumente empregados na cultura do tabaco. Referência: Lima (2000) *apud* Almeida GEG (2005).

A ampla utilização de agrotóxicos, o desconhecimento dos riscos associados a sua manipulação, o conseqüente desrespeito às normas básicas de segurança, a livre comercialização, a grande pressão comercial por parte das empresas distribuidoras e produtoras e os problemas sociais encontrados no meio rural constituem importantes causas que levam ao agravamento dos quadros de contaminação humana e ambiental observado no Brasil (Moreira *et al.*, 2002).

É importante ressaltar que a fumicultura no Rio Grande do Sul é de pequeno porte e uma atividade eminentemente familiar, em que adultos e crianças se ajudam mutuamente no trabalho. Crianças na lavoura de fumo trabalham praticamente todos os dias, auxiliando seus pais nas plantações de tabaco (Bittencourt, 2007). Esse problema é ainda mais preocupante devido o desconhecimento da ação de uma exposição continuada sobre o corpo humano ainda em desenvolvimento e, devido a suspeita de que algumas substâncias utilizadas como agrotóxicos apresentem atividade carcinogênica ou hormonal (Moreira *et al.*, 2002).

De acordo com o agrônomo Jorge Kampf, da Associação dos Fumicultores do Brasil, os produtos mais utilizados nesta cultura são: oxicleto de cobre (fungicida inorgânico a base de cobre, classe toxicológica IV, altamente persistente no ambiente), mancozeb

(fungicida ditiocarbamato, classe toxicológica II), metalaxil (fungicida metil ester, classe toxicológica III), ipridione (fungicida dicarboximide, classe toxicológica III), acefato (inseticida organofosforado, classe toxicológica III), tiametoxam (inseticida nitroguanidina, classe toxicológica III), imidaclopride (inseticida nitroguanidina e piridimetilamina, classe toxicológica IV), clomazone (herbicida isoxazolidinona, classe toxicológica III), sulfentazone (herbicida pré-emergente) e setoxidim (herbicida pós-emergente, classe toxicológica II) (AFUBRA, 2011). Porém, de acordo com Agostinetti *et al.* (2000), um número maior de agroquímicos é recomendado à produção de fumo (Tabela 2).

Tabela 2: Principais agrotóxicos recomendados para a cultura do fumo

Nome do Produto	Grupo químico	Composição	Classe toxicological	Toxicologia
Acefato Fersol 750 PS	inseticida e acaricida organofosforado	Acefato	IV	pouco tóxico
Orthene 750 BR	inseticida e acaricida organofosforado	Acefato	IV	pouco tóxico
Doser	inseticida organofosforado	Clorpirifós	II	altamente tóxico
Confidor 700 GRDA	inseticida nitroguanidinas	Imidacloprid	IV	pouco tóxico
Lorsban 480 BR	inseticida, acaricida organofosforado	Clorpirifós	II	altamente tóxico
Solvirex GR 100	inseticida, acaricida organofosforado	Disulfoton	III	medianamente tóxico
Furadan 50 G	inseticida, nematicida carbamato	Carbofuran	I	extremamente tóxico
Bromex	inseticida, fungicida e nematicida fumigante	Brometo de metila + cloropicrina	I	extremamente tóxico
Bromo Fersol	herbicida, inseticida, fungicida e nematicida fumigante	Brometo de metila + cloropicrina	I	extremamente tóxico
Bromo Flora	herbicida, inseticida, fungicida e nematicida fumigante	Brometo de Metila + cloropicrina	I	extremamente tóxico
Basamid G	inseticida, nematicida, herbicida tiadiazinas	Dazomet	III	medianamente tóxico
Carbaryl Fersol pó 75	inseticida carbamato	Carbaril	III	medianamente tóxico
Sevin 850 PM	inseticida carbamato	Carbaril	II	altamente tóxico
Dithane PM	fungicida ditiocarbamato	Mancozeb	III	medianamente tóxico
Manzate 800	fungicida ditiocarbamato	Mancozeb	III	medianamente tóxico
Tecto 600	fungicida benzimidazol	Thiabendazole	IV	pouco tóxico
Rovral PM	Fungicida hidantoinas	Iprodione	IV	pouco tóxico
Cobre Sandoz BR	fungicida e bactericida cúprico	Óxido cuproso	IV	pouco tóxico
Ridomil 50 GR	Fungicida alianatos	Metalaxil	IV	pouco tóxico
Primeplus BR	Antibrotante dinitroanilinas	Fumetralin	IV	pouco tóxico
Amex	Antibrotante dinitroanilinas	Butralin	II	altamente tóxico
Antak BR	hntibrotante estimulante	n-decanol	III	medianamente tóxico
Devrinol 500 PM	herbicida propionamidas	Napropamide	III	medianamente tóxico
Gamit	herbicida isoxazolidinonas	Clomazone	II	altamente tóxico
Herbadox 500 CE	herbicida dinitroanilinas	Pendimethalin	II	altamente tóxico
Fusilade 125	herbicida aril oxi fenoxi propionato	Fluazifop-p-butil	II	altamente tóxico

Poast	herbicida hidroxi-ciclohexeno	Setoxidim	II	altamente tóxico
Assist	inseticida, acaricida hidrocarbonetos	óleo mineral parafínico	IV	pouco tóxico
Lesmix	moluscicida acetaldeído	Metaldeído	III	medianamente tóxico
Lesmicida pikapau	moluscicida acetaldeído	Metaldeído	III	medianamente tóxico
Mirex S	formicida sulfonamides fluoro-alifáticas	Sulfluramida	IV	pouco tóxico
Roundup	herbicida derivado da glicina	Glifosato	IV	pouco tóxico
Glifosato nortox	herbicida derivado da glicina	Glifosato	IV	pouco tóxico

Fonte: Etges *et al.* (2002)

A quantidade de agroquímicos utilizadas na fumicultura é bastante variável. Schoenhals *et al.* (2009) afirmam que 50% dos fumicultores utilizam agrotóxico de acordo com a recomendação do técnico e 50% utilizam quando acham necessário. Blecher (1996) relata que os fumicultores gaúchos utilizam aproximadamente 15 kg de princípio ativo por hectare. Já Falk *et al.* (1996) afirmam que em média são usados 60 kg de agrotóxicos por hectare, dependendo do ano, devido à seca e conseqüente aumento de pragas, a média pode alcançar 100 kg de agrotóxico por hectare de tabaco. Resíduos de pesticidas foram encontrados em amostras de sangue de fumicultores em níveis acima do normal, 63% dos indivíduos com metomil (carbamato), 56% com thiodicarb (carbamato); 62% com cipermetrina (piretróide), 49% imidaclopride (nitroguanidina), 32% com metamidófos (organofosforado) e 27% com endosulfan (ciclodienoclorado) (Khan *et al.*, 2008).

A elevada demanda de pulverizações e o uso pesado e repetido de agrotóxicos causam danos aos fumicultores e exigem cuidados com a segurança no trabalho através da utilização adequada de Equipamentos de Proteção Individual (EPI). A não utilização do EPI conduz a intoxicações crônicas e agudas que têm provocado vítimas entre as famílias dos fumicultores. A indústria normalmente fornece o EPI aos fumicultores e tem trabalhado pela redução no uso de agrotóxicos, no entanto, a utilização dos mesmos ainda ocorre em larga escala e a maioria dos fumicultores não está devidamente habilitado ao manuseio (Agostinetti *et al.*, 2000) ignorando os procedimentos de segurança apropriados à manipulação destes produtos (NIOSH, 1996). Muitos dos fumicultores não utilizam o EPI durante a aplicação de pesticidas. Poucos utilizam botas (31%), máscaras (14%) e luvas (9%) (Khan *et al.*, 2010). Schoenhals *et al.* (2009) afirmam que apenas 10% dos fumicultores utilizam o EPI completo.

O grau de intoxicação devido à exposição a múltiplos agrotóxicos é variável e depende de muitos fatores como, por exemplo, a via de absorção, as características individuais dos

agrotóxicos, a suscetibilidade de cada indivíduo exposto, entre outros (Maroni *et al.*, 2000; Ramos e Silva, 2004; Araújo *et al.*, 2007; Da Silva *et al.*, 2008). Para Joksic *et al.* (1997), a forma de aplicação dos agrotóxicos também constitui um fator importante, uma vez que foi possível observar maior dano genético entre agricultores que se expuseram a substâncias químicas através da aplicação por pulverizações. Efeitos crônicos a saúde tem sido observados devido a esta exposição, incluindo efeitos neurológicos, reprodutivos ou no desenvolvimento e neoplasias (Bolognesi *et al.*, 2011). Aumento no risco de leucemia e linfomas não-Hodking tem sido associado à exposição a pesticidas (Joksic *et al.*, 1997; Bolognesi, 2003; Costa *et al.*, 2006). Além destes, outros tipos de cânceres podem ser originados, como mieloma múltiplo, sarcoma de tecidos moles, sarcoma de pulmão, câncer de pâncreas, estômago, fígado, bexiga e vesícula (Blair e Freeman, 2009). Também foram observados, alterações no funcionamento do sistema nervoso central e por isso podem estar relacionados ao Mal de Parkinson e de Alzheimer (Domico *et al.*, 2007; Bolognesi, 2003; Da Silva *et al.*, 2008). Problemas no funcionamento do sistema endócrino também foram relatados (Roldan-Tapi *et al.*, 2005; Costa *et al.*, 2006).

A prevalência de problemas de saúde mental e de suicídios em famílias envolvidas com a plantação de fumo é significativa, estando o uso de agrotóxicos organofosforados associado a este fato. Aplicado via de regra, em quantidades excessivas e sem equipamento de proteção individual, os resíduos deste agrotóxico são absorvidos principalmente através da respiração e pele, podendo causar “síndromes cerebrais orgânicas ou doenças mentais de origem não psicológica” (Falk *et al.*, 1996). Os inseticidas da classe dos organofosforados, bem como os carbamatos, atuam no organismo humano inibindo uma enzima denominada colinesterase. Essa enzima atua na degradação da acetilcolina, um neurotransmissor responsável pela transmissão dos impulsos no sistema nervoso (central e periférico). Uma vez inibida, essa enzima não consegue degradar a acetilcolina, ocasionando um distúrbio chamado de “crise colinérgica”, principal responsável pelos sintomas observados nos eventos de intoxicação aguda por esses produtos (Peres e Moreira, 2007).

Segundo Glantz *et al.* (1996) a saúde das famílias dos agricultores que cultivam fumo é sistematicamente agredida de diversas formas: a) pelo uso de agrotóxicos; b) pelo contato direto com a planta úmida, que libera nicotina, sendo esta absorvida pela epiderme; c) pelos particulados liberados das folhas durante a secagem nas estufas. Portanto, ameaça à

saúde dos trabalhadores inclui a grande quantidade de pesticidas utilizados no cultivo do tabaco assim como à manipulação das folhas de fumo molhadas (NIOSH, 1996), pois além das substâncias antropogênicas persistentes, citadas acima, outros compostos orgânicos com potencial pesticida estão presentes nas folhas do tabaco. Onuki *et al.* (2003) salientam que os efeitos sinérgicos da nicotina e dos pesticidas devem ser examinados. Porém, apesar dos progressos no desenvolvimento de modelos ao acesso da toxicidade dos compostos químicos, modelos à toxicidade das misturas químicas ainda não foram realizados. Em parte, isto se deve a enorme complexidade destes efeitos nos sistemas vivos (Butterworth, 1995). A genotoxicidade das misturas tem sido encontrada por estar sinergicamente aumentada, comparada aos componentes testados individualmente (Pandey *et al.*, 1995).

I.1.2 PESTICIDA NATURAL: NICOTINA

Os pesticidas naturais são substâncias tóxicas produzidas pelas plantas aparentemente para sua defesa contra vírus, bactérias, fungos e animais predadores. A planta do tabaco apresenta na sua composição alcalóides, compostos fenólicos tais como flavonóides e cumarina e, traços de saponinas (Da Silva *et al.*, *in prep*). A nicotina é um alcalóide encontrado principalmente nas plantas da família Solanaceae e amplamente distribuído em 12 famílias e 24 gêneros (Leete, 1983).

A principal discussão a cerca dos efeitos tóxicos da nicotina presente no fumo está relacionada ao hábito de fumar. Entretanto, o contato com esta pequena molécula pode ocorrer através de tratamentos anti-tabagismo (adesivos, goma de mascar, “spray” nasal), sob doses controladas, ou através da exposição de trabalhadores nas lavouras de fumo. Estima-se que as folhas úmidas do tabaco contenham de 6 a 8% de nicotina (Hinds, 1882) e que durante o tempo de colheita os trabalhadores do campo podem ser expostos a mais de 600 ml de orvalho ou chuva, da superfície das folhas do fumo, equivalente a nicotina contida em 36 cigarros (NIOSH, 1996).

Estudos do potencial genotóxico da nicotina geralmente demonstram resultados controversos. A nicotina não foi genotóxica em *Salmonella typhimurium* (Riebe *et al.*, 1982; De Flora *et al.*, 1984), apresentando resultados negativos e positivos para *Escherichia coli* (Riebe *et al.*, 1982; De Flora *et al.*, 1984) A nicotina, em dose de 5mg/kg, aumentou a frequência média de aberrações cromossômicas em células da medula óssea de

hamster chinês (Munzner e Renner, 1989), mas não foi clastogênica em doses orais de 1 e 2 mg/kg em camundongos (Adler e Attia, 2003). Em altas concentrações aumentou as trocas entre cromátides irmãs (SCEs) e as aberrações cromossômicas de células de ovário de hamster chinês (CHO) sem ativação metabólica (ação direta) (Trivedi *et al.*, 1990), apresentou efeito clastogênico em eritrócitos de camundongos (Attia, 2007a, b) e efeito genotóxico, avaliado pelo ensaio Cometa, em células de *Caenorhabditis elegans* (Sobkowiak e Lesicki, 2009). Para o Teste *Salmonella* (Teste de Ames) a nicotina e seus quatro maiores metabólitos não foram genotóxicos (Doolittle *et al.*, 1995). Em contraste, genotoxicidade da nicotina foi demonstrado em linfócito periférico humano e em tecido linfático de tonsilas palatinas, demonstrando significativo aumento na migração do DNA pelo ensaio Cometa (Kleinsasser *et al.*, 2005), assim como em células do epitélio nasal (Sassen *et al.*, 2005).

Em humanos, a nicotina é facilmente absorvida pela pele. Assim, quando os trabalhadores rurais entram em contato com a folha do fumo, alta quantidade de nicotina transdermal é observada (Arcury *et al.*, 2003), porém os possíveis danos genotóxicos ocasionados são ainda desconhecidos.

A pele, os queratinócitos, os fibroblastos e os vasos sanguíneos possuem receptores nicotínicos que auxiliam a absorção da nicotina (Misery, 2004). Além disso, suas propriedades físico-químicas, tais como: alta solubilidade tanto em solvente polar e não-polar ($\log K_w=1,17$) e baixo peso molecular (162,2 g/mol) (Zorin *et al.*, 1999) facilitam sua entrada no organismo. Quando em contato com a pele humana, a nicotina difundiu-se facilmente ao longo do estrato córneo, penetrando nas camadas internas e atingindo os vasos sanguíneos (Guy e Hadgraft, 1989).

A absorção da nicotina aumenta com o aumento da superfície exposta e com a presença de machucados e umidade na pele. Variáveis que influenciam a vasodilatação (calor, temperatura alta ou baixa, consumo de álcool, uso de cigarro) também podem afetar esta absorção (Quandt *et al.*, 2000).

A nicotina é absorvida e metabolizada pelo citocromo P450, sendo a enzima citocromo P450 2A6 (CYP2A6) responsável por 90% da metabolização desta molécula (Nakajima *et al.*, 1996). Os principais metabólitos são: cotinina, óxido-N'-nicotina, óxido-N-cotinina e trans-3'-hidroxicotinina. Estudos do potencial genotóxico destes metabólitos são limitados (Doolittle *et al.*, 1995). Tipicamente, 70-80% de nicotina é convertida em cotinina. A

meia-vida relativamente curta da nicotina exclui seu uso como marcador preciso da quantidade absorvida. Assim, a cotinina que é o metabólito principal da nicotina e tem uma meia-vida de aproximadamente 15-17 horas tem sido assumida como medida bioquímica apropriada (Tricker, 2003).

A nicotina, através do contato dermal com as folhas do fumo, tem causado um envenenamento agudo nos trabalhadores da lavoura (Gehlbach, 1975). O conjunto de sintomas desta exposição é conhecido como “green tobacco sickness” (GTS) ou doença da folha verde. Os critérios para o diagnóstico de GTS têm sido estabelecidos. Os sintomas incluem: náusea, vômito, tontura, dor de cabeça, diarreia, fraqueza, perda do apetite, dor e cólicas abdominais, visão embaçada, lacrimejar constante, abatimento, dificuldade em respirar e algumas vezes variação na pressão sanguínea e na frequência cardíaca (Arcury *et al.*, 2003; Onuki *et al.*, 2003; Arcury *et al.*, 2008). Os sintomas iniciam em 3 a 17 horas depois do início da exposição (McBride *et al.*, 1998). Os trabalhadores com GTS se recuperam em 2 a 3 dias. Contudo, sintomas mais severos resultam em desidratação e necessidade urgente de cuidado médico (Arcury *et al.*, 2003). Em casos mais extremos, é administrado anti-eméticos, anti-histaminicos e feita hidratação intravenosa (McBride *et al.*, 1998). Apesar da ampla produção de tabaco e do risco de GTS, a literatura médica é fraca. Segundo Schmitt *et al.* (2007) há um pouco mais do que 30 artigos publicados de GTS na pesquisa científica. No Brasil, somente Oliveira *et al.* (2010) relataram a presença da doença da folha verde em trabalhadores da fumicultura. No Rio Grande do Sul, a contaminação por nicotina no município de Candelária foi publicada no jornal local (Zero Hora, 2009a, b).

Foi observada por Parikh *et al.* (2005) uma prevalência geral de GTS em 47% dos trabalhadores rurais na lavoura de fumo, esta quantidade foi quase similar ao registrado por (Quandt *et al.*, 2000) cinco anos antes. O nível de cotinina nos fumicultores foi significativamente maior do que os não expostos (Onuki *et al.*, 2003) e se observou relação entre a quantidade de cotinina salivar e a prevalência de GTS (Arcury *et al.*, 2003), corroborando a hipótese de que GTS esteja associada à exposição de nicotina.

Os agricultores, durante o cultivo, estão expostos diretamente a folhas do fumo (Figura 3) nas seguintes condições: na plantação das mudas; na capação (retirada das flores para que as folhas se desenvolvam mais, com mais peso e qualidade e com maior quantidade de nicotina); na aplicação de veneno (antibrotante); na colheita; no carregamento dos maços

até os galpões; na separação e classificação das folhas; na amarração em forma de cordão para secagem.



Figura 3: Cultivo do tabaco: a) capação, b) aplicação de veneno, c) colheita, d e e) mãos dos trabalhadores, f) maços carregados.

O preparo e a colheita ocorrem no início da manhã quando as plantas estão úmidas com orvalho, encharcando as roupas dos trabalhadores. É sabido que 9 mg de nicotina podem ser encontradas em 100 ml de orvalho (McBride *et al.*, 1998). A resina da planta forma uma camada grossa de goma (principalmente na retirada dos botões e na colheita das folhas) que solidifica nas roupas e na pele dos trabalhadores. No calor os trabalhadores retiram suas camisas expondo diretamente a pele (Parikh *et al.*, 2005).

O processo de colheita resulta em arranhões e descascamento da pele ao redor da unha. Por não terem o hábito de usar luvas de proteção, pois estas se tornam um impedimento quando ficam duras e pegajosas, os trabalhadores facilitam a absorção da nicotina através da rota dermal (Parikh *et al.*, 2005). O calor e a umidade nos campos fazem com que luvas e roupas de proteção sejam extremamente desconfortáveis (Quandt *et al.*, 2000). Entre os trabalhadores da lavoura de fumo no sul do Brasil, 55% não usam as roupas de proteção recomendada, assim como luvas e botas. Os fumicultores reclamam que as roupas não são projetadas para o clima quente da época do plantio e colheita, que vai de outubro a março (NIOSH, 1996).

De acordo com essas características, Quandt *et al.* (2000) tem apresentado um modelo do biocomportamento da GTS (Figura 4) baseado nas pesquisas existentes e na fisiologia da absorção percutânea de nicotina.

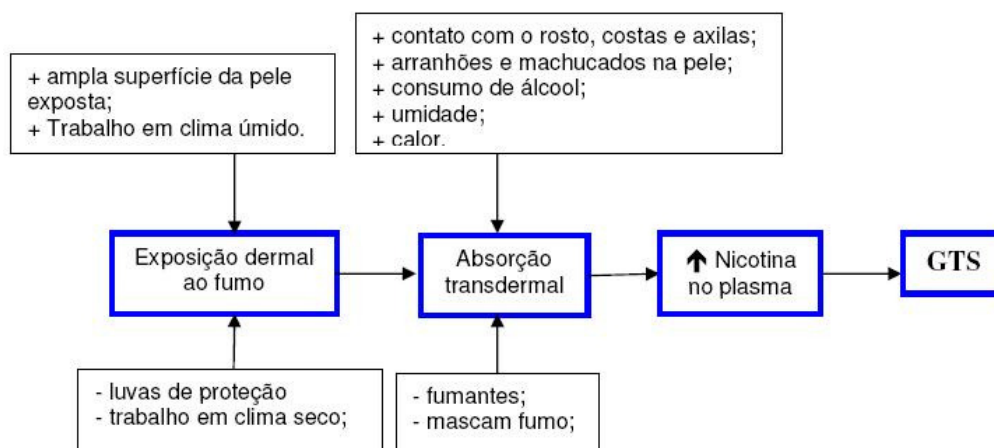


Figura 4: Modelo do biocomportamento da GTS.

Estudos envolvendo a toxicidade das folhas de fumo são limitados. Omoniyi *et al.* (2002) avaliaram o efeito do pó preparado com folhas de fumo em *Clarias gariepinus* e encontraram a toxicidade aguda como sendo LC50 em 48 h de 626 mg por litro de água. Este valor foi bem maior do que o estimado no estudo (Agbon *et al.*, 2002) com *Oreochromis niloticus*, registrado em 109,6 mg/L, indicando assim, que *C. gariepinus* foi mais resistente à toxicidade do tabaco do que *O. niloticus*. Extrato da folha de *N. tabacum* em metanol (60%) exibiu atividade antibacteriana em seis de nove culturas a concentrações de 25 mg/mL. Isolados de *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Shigella dysenteriae*, *Staphylococcus aureus* foram inibidas e *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus vulgaris* não foram inibidas (Akinpelu e Obuotor, 2000). Exposição dermal a folhas de fumo em *Mus musculus* causou dano oxidativo nas células de sangue e efeito genotóxico e mutagênico em alguns tecidos (Da Silva *et al.*, 2010). Utilizando molusco como organismo bioindicador, Da Silva *et al.* (*in prep*) observou um aumento no dano nas células de hemolinfa avaliadas pelo ensaio Cometa e pelo teste de Micronúcleos, bem como a redução da atividade do citocromo P450.

Não há informação dos efeitos crônicos à saúde, devido à exposição dermal da nicotina. Para trabalhadores rurais que já correm riscos de terem doenças relacionadas ao

trabalho (dermatite, câncer, infertilidade) ou outros riscos (envenenamento por pesticidas) em proporção maior do que a população geral, exposição à nicotina e GTS podem contribuir com problemas de saúde a longo prazo (Quandt *et al.*, 2000; Schmitt *et al.*, 2007).

I.1.3 AVALIAÇÃO DO RISCO OCUPACIONAL E O USO DE BIOMARCADORES

O risco ocupacional tem origem nas atividades insalubres, aquelas cuja natureza, condições ou métodos de trabalho, bem como os mecanismos de controle sobre os agentes biológicos, químicos, físicos e mecânicos do ambiente podem provocar efeitos adversos à saúde dos trabalhadores (Mauro *et al.*, 2004).

Classicamente, os fatores de risco para a saúde e segurança dos trabalhadores, presentes ou relacionados ao trabalho, de acordo com a Organização Pan-Americana da Saúde no Brasil, podem ser classificados em cinco grandes grupos: (1) físicos- agressões ou condições adversas de natureza ambiental; (2) químicos- agentes e substâncias químicas; (3) biológicos- microorganismos geralmente associados ao trabalho; (4) ergonômicos e psicossociais - que decorrem da organização e gestão do trabalho; (5) de acidentes- ligados à atividades que podem levar a acidentes do trabalho (Mauro, 1991).

Exposição a agentes genotóxicos em nosso ambiente pode causar uma variedade de efeitos sobre a saúde humana. Alguns deles se expressam imediatamente, enquanto outros levam anos para se manifestarem. Efeitos tardios bem reconhecidos incluem a indução de câncer, doenças genéticas nas gerações seguintes, desordens de desenvolvimento, entre outros (Maluf e Erdtmann, 2003). Estimativas indicam que a exposição ocupacional é a causa de 4% de todos os casos de câncer em humanos. Trabalhadores de diferentes áreas ocupacionais estão potencialmente expostos a substâncias genotóxicas que podem causar alterações genéticas tanto em células somáticas como em células germinativas (Kvitko, 2003). Pesquisas epidemiológicas recentes têm caracterizado incidência de cânceres específicos em agricultores, como linfoma não-Hodgkin, múltiplos mielomas, leucemia, câncer no cérebro, na próstata, entre outros (Blair e Freeman, 2009).

É crescente a preocupação sobre o efeito mutagênico e carcinogênico de agentes genotóxicos em populações humanas expostas ocupacionalmente. Esforços contínuos têm sido feitos para identificar os agentes perigosos, reconhecer condições de exposição danosa

e monitorar populações que podem estar sofrendo exposição excessiva, com o objetivo de prevenir conseqüências adversas sobre a população (Maluf e Erdtmann, 2003). O quadro para avaliação da genotoxicidade se torna mais complicado se considerarmos a quantidade de agentes simples e de misturas complexas envolvidas na fumicultura.

A mistura é definida como a combinação de dois ou mais agentes ambientais (Sexton e Hattis, 2007). Misturas podem ser classificadas como sendo simples ou complexa. Misturas simples contêm um número bem definido de compostos, em contraste à mistura complexa (Groten *et al.*, 2001). A mistura pode ser intencionalmente produzida, gerada ou pode surgir ao acaso. O impacto à saúde humana destas substâncias é desconhecido (Silins e Hogberg, 2011). Há dois princípios que descreve como a substância individual pode ser afetada na mistura: por aditividade e por interação. Aditividade assume que as substâncias atuam de modo semelhante ou diferenciado, resultando em adição de dose ou efeito. Interação assume que substâncias individuais afetam a toxidade uma da outra, ou por sinergismo ou por antagonismo (mais ou menos como o efeito aditivo) (Cassee *et al.*, 1998). A toxicidade de misturas complexas não é simples de predizer. Modos de ação de algumas substâncias podem ser desconhecidos e os efeitos da interação entre elas podem diferir dependendo da dose (Silins e Hogberg, 2011).

Diferentes estratégias são utilizadas para avaliar os efeitos e os riscos de misturas e de exposição combinada. Com este intuito, o uso de diferentes biomarcadores no estudo do risco ocupacional vem sendo adotado.

O termo biomarcador é um termo geral para medidas específicas da interação entre um sistema biológico e um agente ambiental. De acordo com o Programa Internacional de Segurança Química (IPCS, 2004), três classes de biomarcadores podem ser identificadas: (a) biomarcadores de exposição; (b) biomarcadores de efeito; e (c) biomarcadores de suscetibilidade.

Biomarcadores de exposição envolvem substâncias exógenas ou os seus metabólitos ou o produto de uma interação entre um agente xenobiótico e alguma célula ou molécula alvo que é medida em um compartimento dentro do organismo. Biomarcadores de efeito são medidas bioquímicas, fisiológicas ou comportamentais ou outras alterações dentro do organismo que, dependendo da magnitude, podem ser reconhecida em associação a uma possível doença. Biomarcadores de suscetibilidade indicam uma habilidade inerente ou

adquirida de um organismo em responder a mudanças de exposição a substâncias xenobióticas específicas (Jakubowski e Trzcinka-Ochocka, 2005).

Biomarcadores de exposição são de preferência específicos para o xenobiótico, enquanto biomarcadores de efeito com frequência são inespecíficos para um agente em questão. Isto sugere que biomarcadores de efeito tem um potencial maior para refletir exposição complexa, podendo ajudar a identificar os componentes ativos da exposição a misturas bem como suas consequências (Silins e Hogberg, 2011).

Exemplos de biomarcadores de exposição usados em muitos estudos da avaliação do risco ocupacional são: (a) o ensaio Cometa ou teste alcalino eletroforético de célula-única, que permite detectar diferenças intercelulares de dano e reparo ao DNA em qualquer população de célula eucariótica (Ribas *et al.*, 1995). Muitos trabalhos têm observado, através desta técnica, genotoxicidade em agricultores expostos a pesticidas (Grover *et al.*, 2003; Da Silva *et al.*, 2008; Lebailly *et al.*, 2009; Paiva *et al.*, 2011); (b) a técnica PIXE (emissão de partículas por raios-X), que vem sendo utilizada na identificação de metais presentes no solo e em outras amostras ambientais (Cruvinel *et al.*, 1999; Heuser *et al.*, 2002; Nsouli *et al.*, 2004; Andrade *et al.*, 2004), incluindo detecção de elementos traço em plantas (Mireles *et al.*, 2004) e em amostras biológicas como sangue (Da Silva *et al.*, 2010b); (c) dosagem de metabólitos como, por exemplo, a cotinina que tem sido utilizado como biomarcador da exposição à nicotina (Doolittle *et al.*, 1995; Quandt *et al.*, 2000; Arcury *et al.*, 2003; Onuki *et al.*, 2003).

Há biomarcadores de efeito relevantes no biomonitoramento humano, são eles: (a) o teste de Micronúcleos, que é um biomarcador de efeito da genotoxicidade causada pelo xenobiótico, através do dano ao DNA. Os micronúcleos (MN) são pequenos corpúsculos similares em estrutura ao núcleo, podendo ser formados a partir de perdas de fragmentos acêntricos; por uma variedade de consequências mecânicas de quebra e troca cromossômica e por perda de cromossomos inteiros (Heddle *et al.*, 1991). Estudos recentes têm evidenciado o uso de diferentes células na avaliação do risco ocupacional, frequência de micronúcleos em indivíduos expostos a pesticidas tem sido observado em mucosa oral (Bortoli *et al.*, 2009; Remor *et al.*, 2009) e em cultura de linfócitos (Bolognesi *et al.*, 2011). Além disso, outras anomalias nucleares têm sido investigadas através do teste de MN (Fenech *et al.*, 2011), como brotos nucleares (NBUD) e pontes nucleoplasmáticas (NPB); (b) medidas das alterações no sistema biológico, como por exemplo, a inibição da

colinesterase por exposição a pesticidas organofosforados (Salvador *et al.*, 2008; Remor *et al.*, 2009; Pathak *et al.*, 2011); e a avaliação de parâmetros hematológicos (Remor *et al.*, 2009; Khan *et al.*, 2010; Lal e Ames, 2011). Marcador de estresse oxidativo tem sido demonstrado por ser um sensível biomarcador de efeito em baixas e altas doses de exposição combinada (Silins e Hogberg, 2011). No que refere à exposição a pesticidas, o nível dos marcadores de estresse oxidativo tem sido investigado (Abdollahi *et al.*, 2004; Muniz *et al.*, 2008; Salvador *et al.*, 2008).

Para evitar o acúmulo, a toxicidade e os danos causados por muitos xenobióticos, há no organismo, um conjunto de genes responsáveis pela metabolização e detoxificação destas substâncias assim como genes relacionados ao sistema de reparo, caso estes xenobióticos afetem o material genético.

A capacidade de biotransformação está extremamente relacionada com polimorfismos nos genes das enzimas de metabolização/detoxificação, e conseqüente alteração da atividade de enzimas que participam deste processo (Wilkinson e Clapper, 1997). Pesquisas têm revelado a associação de polimorfismos de genes envolvidos na metabolização e o dano ao DNA em agricultores (Falck *et al.*, 1999; Schoket *et al.*, 2001; Da Silva *et al.*, 2008; Dusinska e Collins, 2008).

A maior parte dos processos de biotransformação ocorre em duas fases, dependendo do substrato em que ele estiver atuando. As enzimas de fase I, ou enzimas de ativação, representadas pela superfamília do citocromo P450, ativam o xenobiótico, tornando o mais eletrofílico e desta forma mais reativo, normalmente com a introdução de um grupamento funcional. Já as enzimas de fase II, ou de detoxificação, como a superfamília glutational S-transferase (GST), normalmente atuam com a conjugação dos metabólitos com um substrato endógeno, por enzimas transferases. O resultado deste processo é a transformação dos metabólitos em substâncias hidrofílicas, e assim, passíveis de excreção (Wilkinson e Clapper, 1997; Guecheva e Henriques, 2003).

Diferenças na capacidade de biotransformação, devido aos polimorfismos nos genes das proteínas envolvidas, já foram demonstradas como responsáveis pelas diferenças individuais nos resultados do ensaio Cometa e teste de MN (Hernandez *et al.*, 2006; Da Silva *et al.*, 2008). Entre as enzimas de fase I, ou de ativação, podemos citar os polimorfismos que ocorrem no gene *CYP2A6*, responsável pela metabolização da nicotina e da cotinina. Enquanto que nas enzimas de fase II, os polimorfismos mais estudados são

os que ocorrem nos genes *GSTM1*, *GSTP1* e *GSTT1*, responsáveis pela conjugação de glutationa em várias espécies reativas (Norppa, 2004).

Outro exemplo de enzima de metabolização de xenobióticos, principalmente de organofosforados, é a paraoxonase, proteína codificada pelo gene *PON1*. Este gene apresenta dois sítios polimórficos nos aminoácidos das posições 55 e 192. Para o polimorfismo na posição 192 o alelo *PON1*Gln* apresenta menor atividade que o alelo *PON1*192Arg*. Isso sugere que os indivíduos com o genótipo *PON1 Gln/Gln* ou *Gln/Arg* possam apresentar maior suscetibilidade à intoxicação a organofosforados que os indivíduos *PON1 Arg/Arg* (Humbert *et al.*, 1993; Da Silva *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2011b).

Estudos com polimorfismos em genes de reparo sugerem que estes também apresentam importância na modulação de efeitos genotóxicos. Alguns trabalhos demonstram a influência destes polimorfismos na atividade enzimática e a relação com a incidência de câncer, na resposta a medicamentos quimioterápicos e radiosensibilidade (Norppa, 2001; Goode *et al.*, 2002; De Ruyck *et al.*, 2005; Efferth e Volm, 2005) e na resposta ao dano causado por exposição ocupacional (Dhillon *et al.*, 2004; Iarmarcovai *et al.*, 2008; Mateuca *et al.*, 2008; Rohr *et al.*, 2011).

Alguns genes do sistema de reparo por excisão de bases (BER) apresentam-se polimórficos e estudos associam estas variações com a suscetibilidade para a incorporação de danos no DNA e para o desenvolvimento de doenças como câncer (Lunn *et al.*, 1999; Hao *et al.*, 2004). Como exemplo, o polimorfismo no códon 326 do gene *OGG1*, resulta em uma troca do aminoácido serina por uma cisteína. Esta variante (*OGG1326Cys*) gera uma proteína com maior atividade enzimática atuando no reparo causado por lesões derivadas de estresse oxidativo. Estudos deste polimorfismo sugerem o como um fator de risco de uma variedade de tumores humanos (Kohno *et al.*, 1998; Takezaki *et al.*, 2002; Ito *et al.*, 2002; Hansen *et al.*, 2005).

Outro exemplo é o gene *XRCC1* que apresenta polimorfismos nos códon 194 (Arg/Trp) e 399 (Arg/Gln), gerando uma proteína com maior e menor eficiência de reparo, respectivamente, quando comparados com os alelos selvagens (Wang *et al.*, 2003). Au *et al.* (2003) demonstraram a associação do polimorfismo *XRCC1 399Arg* com troca de cromátides-irmãs por exposição a raios-X, como também com células aberrantes por exposição à luz UV.

O reparo por recombinação homóloga (HRR) atua nas quebras duplas presentes logo após a duplicação do DNA. Neste processo estão envolvidas mais de 16 proteínas, incluindo a proteína RAD51. Polimorfismos no gene *RAD51* (G135C) levam a diferenças na suscetibilidade no desenvolvimento de leucemia mielóide aguda, de câncer de mama e de câncer gástrico (Wang *et al.*, 2001; Jawad *et al.*, 2006; Poplawski *et al.*, 2006).

Já a recombinação não homologa (NHEJ), faz simplesmente a ligação de duas extremidades de dupla fita quebradas, sem o emprego de moldes. As principais proteínas envolvidas neste mecanismo de reparo são KU e DNA-PKCS. A proteína KU reconhece as extremidades livres, ligando-se a elas, facilitando o acesso de DNA-PKCS à região. Logo após ocorre o recrutamento de XRCC4 e da DNA ligase IV que efetuarão a junção das extremidades (Goode *et al.*, 2002; Costa e Menck, 2004). Diferentes polimorfismos no gene *XRCC4* têm sido registrados (Ford *et al.*, 2000). O polimorfismo *XRCC4 Ile→Thr* foi investigado em viticultores, onde indivíduos que apresentaram o alelo *XRCC4*Thr* tiveram maior frequência de MN, indicando uma menor atividade do alelo variante (*Thr*) (Rohr, 2008).

Assim, biomarcadores de suscetibilidade podem incluir polimorfismos de genes específicos associados com o metabolismo de xenobióticos e com o reparo ao DNA (Silins e Hogberg, 2011). Avaliação da exposição humana, associada aos conhecimentos relativos aos efeitos em biomarcadores de exposição, de efeito e de suscetibilidade nos indivíduos expostos, permite estabelecer prioridades e formas de intervenção na tentativa de prevenir ou amenizar a interação das substâncias químicas com o organismo humano.

I.2 OBJETIVOS

Devido ao pouco conhecimento dos efeitos genotóxicos dos compostos presentes na folha do fumo e do risco ocupacional envolvendo os fumicultores, este último relacionado ao contato com as folhas de fumo e à manipulação de agrotóxicos, se teve por objetivos neste trabalho:

- (1) Avaliar possíveis efeitos genotóxicos nos trabalhadores expostos ao fumo e aos agrotóxicos pelo ensaio Cometa;
- (2) Avaliar a instabilidade genômica, morte celular e mutagenicidade nestes trabalhadores pelo teste de Micronúcleos em linfócito e mucosa oral;
- (3) Dosar a quantidade de cotinina no sangue dos agricultores da lavoura de fumo, como marcador de exposição à nicotina contida nas folhas;
- (4) Avaliar a atividade da enzima butirilcolinesterase no sangue dos fumicultores, como marcador de exposição a pesticidas organofosforados;
- (5) Verificar valores do hematócrito dos trabalhadores;
- (6) Determinar o grau de estresse oxidativo pela peroxidação lipídica e pela atividade do superóxido dismutase e da catalase nos fumicultores;
- (7) Quantificar e/ou identificar a deposição de elementos traço, principalmente metais, no sangue dos fumicultores, através da técnica PIXE;
- (8) Identificar os polimorfismos dos genes do metabolismo *GSTT1*, *GSTM1*, *GSTP1*, *CYP2A6* e *PON* através da técnica de reação em cadeia da Polimerase (PCR);
- (9) Determinar as freqüências de polimorfismos de genes de reparo *OGG1*, *XRCC1*, *RAD51* e *XRCC4* através da técnica de reação em cadeia da Polimerase (PCR);
- (10) Relacionar os genótipos dos genes encontrados com os resultados dos testes de genotoxicidade e mutagenicidade.

CAPÍTULO II

Occupational risk in tobacco farmers: genotoxic assessment at different crop times

Fernanda Rabaioli Da Silva¹, Kátia Kvitko^{1,*}, Paula Rohr¹, Marina B. Abreu³, Flávia Valladão Thiesen³, Juliana Da Silva^{2,*}

¹Postgraduate Programme in Genetics and Molecular Biology, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil, ²Laboratory of Genetic Toxicology, Postgraduate Programme in Genetic and Applied Toxicology, Lutheran University of Brazil, Canoas, RS, Brazil, ³Toxicology Institute, Catholic Pontificie University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

*Corresponding Authors: Dr^a. Juliana da Silva, Universidade Luterana do Brasil, ULBRA, Canoas, RS, Brazil. Telephone: +55 (51) 3477-4000 (2774), e-mail: juliana.silva@ulbra.br; Dr^a Kátia Kvitko, Departamento de Genética e Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil. Telephone: +55 (51) 3308-6740 (2774), Fax: +55 (51) 3308-7311, e-mail: katia.kvitko@ufrgs.br

Artigo a ser submetido à Mutagenesis

ABSTRACT

Agricultural workers engaged in tobacco cultivation are constantly exposed to large amounts of pesticides as well as to the nicotine present in raw tobacco leaves. Pesticides have been considered potential chemical mutagens: experimental data revealed that various agrochemicals possess mutagenic properties. Studies have assumed that nicotine absorbed through the skin results in the characteristic green tobacco sickness (GTS), an occupational illness reported by tobacco workers. This study sought to determine genotoxic effects in farm workers occupationally exposed to agrochemicals and nicotine. Peripheral blood samples were collected from 30 agricultural workers, at different crop times (off-season, during pesticides application and leaf harvest), and 30 were non-exposed. We obtained data on DNA damage detected by the Comet assay and Micronucleus test as a biomarker of occupational exposure and effect. The serum cholinesterase level, which in general present relation with exposition to organophosphates and carbamates, as well as serum cotinine level, which is a metabolite of nicotine, were also evaluated. The results showed a significant increase in Damage index and frequency in tobacco farmers compared to the non-exposed group, for all different crop times, and a significant increase in micronucleated cells in the off-season group. No correlation was found between age and exposure time in relation to biomarker tests. The DNA damage was greater in males than in females, but with a significant difference only in off-season group. No difference, in cholinesterase activity, was seen among the group of farmers and non-exposed group. Elevated level of cotinine was observed in leaf harvest group. This investigation suggests increased DNA damage in all tobacco crop stages, calling attention to the significant increase during the off-season and tobacco leaf harvest.

Keywords: tobacco farmers, Comet assay, Micronucleus test, pesticide, nicotine

1. Introduction

One of principles of environmental health is to prevent disease and injuries caused by chemical pollutants present in the environment. The main objective is to keep chemical exposure to an acceptable level that does not imply risk. In order to accomplish that, it is necessary to identify and quantify chemical risk through a biological assessment of human exposure [1]. Agricultural workers engaged in tobacco cultivation are constantly exposed to a large amount of pesticides as well as to nicotine present in raw tobacco leaves.

Tobacco plants require a very large amount of pesticides (insecticides, herbicides, fungicides and plant growth regulators) to protect them from insects and disease. The heavy and repeated use of pesticides takes a toll on tobacco farmers, many of whom are unaware of the proper safety procedures necessary to handle these chemicals [2,3]. Pesticides have been considered potential chemical mutagens: experimental data revealed that various agrochemical ingredients possess mutagenic properties. As most occupational and environmental exposures to pesticides are to mixtures, the genotoxic potential evaluated for single compounds could not be extrapolated to humans [4].

In addition, tobacco farmers come into contact with green tobacco leaves and tobacco plants during the tobacco harvest and absorb nicotine through the skin. These farmers present elevated levels of cotinine in urine, blood and saliva [5-9]. Studies have estimated that dermal absorption of nicotine results in the characteristic green tobacco sickness (GTS), an occupational illness reported by tobacco workers worldwide [7]. Symptoms include dizziness, headache, nausea and vomiting, but may also include abdominal cramps, prostration, difficulty in breathing and occasionally blood pressure or heart rate variations [7,10].

In tobacco crops, the simultaneous use of pesticides with different formulations is typical, and combinations vary depending on the time during the growing season. Tobacco farming includes different types of work like sowing, topping flower buds, disbudding axillary buds (suckers), harvesting leaves and plants by sickle, and separation of leaves [11]. Until the leaf harvest, the farmers are exposed to pesticide and during the harvest and separation of leaves also to nicotine, by different routes of exposure such as inhalation and skin absorption.

This scenario limits the applicability of predictive models for risk assessment and it may be difficult to perform biomonitoring of specific compounds to evaluate exposure. The possible combined toxic effects of such a complex exposure, pesticide and nicotine, are not usually known. Thus, toxicity information concerning active ingredients or formulations alone is not sufficient to evaluate the risk of adverse health effects from pesticide exposure [12].

Associations between exposures to pesticides and symptoms, and cholinesterase level significantly reduced in exposed populations are observed [13-15]. The cholinesterase present in neural tissues, and also in erythrocytes, is known as true acetylcholinesterase (AChE). The cholinesterase found in blood serum and synthesized by liver has been termed pseudo- or butyrylcholinesterase (BChE) [13]. Blood cholinesterases have been widely used for monitoring exposure to organophosphate and carbamate pesticides.

A wide range of methods is currently used for the detection of early biological effects of DNA-damaging agents in occupational settings. Assays measuring DNA damage assessed by Comet assay and Micronucleus test have been used extensively in human biomonitoring studies [12,16-21]. In this study, in order to assess whether prolonged exposure to complex mixtures of pesticides and nicotine present in tobacco leaves could

lead to increased genotoxic damage, tobacco farmers from Venâncio Aires and Santa Cruz do Sul (Brazil) were evaluated using the Comet assay in peripheral blood and Micronucleus (MN) test in binucleated lymphocytes. In order to verify the influence of time and type of work during the tobacco growing season on DNA damage, samples were collected in three distinct phases: off-season, pesticide application and leaf harvest. The DNA damage was also analyzed taking into account the use of protective measures, time after exposure, age, and gender difference. The assay of cholinesterase (BChE) activity in serum was applied to estimate inhibition by organophosphates and carbamates and the serum cotinine level was evaluated as biomarker of the nicotine exposure.

2. Methods

2.1. Study population and sample collection

This study was approved by the Committee on Research Ethics of UFRGS, and written informed consent was obtained from each individual before the start of the study.

The study involved a total of 60 individuals from Venâncio Aires and Santa Cruz do Sul (in the northeast region of the state of Rio Grande do Sul, southern Brazil).

Tobacco farmers were sampled from July (2008) to February (2009) at different times in the tobacco crop: off-season, pesticide application and leaf harvest. Blood samples were collected during these three periods for the same tobacco farmers and once for the non-exposed group. All blood samples were collected by venipuncture using vacutainers with heparin, transported to the laboratories at or below 8°C and processed within 8 h of collection, in order to prevent damage associated with storage.

All individuals in the study were asked to answer a Portuguese-language version of a questionnaire from the International Commission for Protection against Environmental

Mutagens and Carcinogens [22] and to participate in a face-to-face interview, which included standard demographic data (age, gender, etc.), as well as questions related to medical issues (exposure to X-rays, vaccinations, medication, etc.), life style (smoking, coffee and alcohol consumption, diet, etc.) and occupation (number of working hours per day, time exposed to pesticide, pesticide application duration, pesticide type, protective measures adopted (PPE), etc. In all groups, individuals who smoked more than twenty cigarettes per day for at least 1 year were considered smokers [23]. All individuals in this study were intentionally selected to be non-smokers in order to eliminate confounding factors, such as cigarette smoking. The non-exposed individuals were office employees living in the same region as the exposed individuals.

2.2. Comet assay

The alkaline Comet assay was performed as described by Singh *et al.*, [24] with the modifications suggested by Tice *et al.* [25]. Blood cells (5 μ l) were embedded in 95 μ l of 0.75% low-melting point agarose, which was immediately added to the surface of a pre-coated (1.5% agarose) microscope slide. When the agarose had solidified, the slides were placed in lysis buffer (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA and 10 mM Tris; pH 10.0–10.5) containing freshly added 1% (v/v) Triton X-100 and 10% (v/v) dimethyl sulfoxide (DMSO) for a minimum of 1 h and a maximum of 2 weeks. After treatment with lysis buffer, the slides were incubated in freshly made alkaline buffer (300 mM NaOH and 1 mM EDTA; pH > 13) for 20 min and the DNA was electrophoresed for 20 min at 25 V (0.90 V/cm) and 300 mA after which the buffer was neutralized with 0.4 M Tris (pH 7.5) and dried overnight. Gels were re-hydrated for 5min in distilled water, and then stained for 15 min (37°C) with a solution containing the following sequence: 34 mL of Solution B

(0.2% w/v ammonium nitrate, 0.2% w/v silver nitrate, 0.5% w/v tungstosilicic acid, 0.15% v/v formaldehyde, 5% w/v sodium carbonate) and 66 mL of Solution A (5% sodium carbonate). The staining was stopped with 1% acetic acid and the gels were air dried [26].

Images of 100 randomly selected cells (50 cells from each of two replicate slides) were analyzed for the same person using bright-field optical microscopy. Two parameters were evaluated: (1) damage index (DI), for which each cell was allocated to one of five classes (from no damage = 0 to maximum damage = 4) according to tail size and shape (see figures in Heuser *et al.*, [20]). The values obtained for each volunteer could range from 0 (0×100) to 400 (4×100); and (2) damage frequency (DF), calculated as the percentage of damaged cells. International guidelines and recommendations for the Comet assay consider that visual scoring of comets is a well-validated evaluation method. Although the DI parameter is subjective, it is highly correlated with computer-based image analysis [25,27]. All the slides were scored blind.

2.3. MN test: cytokinesis-blocked human lymphocyte micronucleus

For each blood sample, duplicate lymphocyte cultures were set up in culture flasks by adding 0.3 ml whole blood to 5 ml PB-MAX™ karyotyping medium (Invitrogen, GIBCO). The flasks were incubated at 37°C for 44 h before adding 5 µg/ml of cytochalasin B (Sigma) and continuing incubation until the total time reached was 72 h, as described by Fenech [28]. After incubation, lymphocytes were harvested by centrifugation at 1200 r.p.m. for 8 min, re-centrifuged, fixed in 3:1 (v/v) methanol/acetic acid, placed on a clean microscope slide and stained with 5% (v/v) Giemsa. For each blood sample, 2000 binucleated cells (BN) (i.e. 1000 from each of the two slides prepared from the duplicate cultures) were scored for MN presence (MNed cells), which was assessed using bright-

field optical microscopy at a magnification of x200–1000. All sides were coded for blind analysis.

2.4. Plasma cholinesterase activity

The measurement of butyrylcholinesterase (BChE) activity was determined by continuous assay using a kit produced by Wiener Laboratory®, which is based on the Ellman *et al.* [29] method, and resulting absorbances were measured with a B442® Micronal spectrophotometer. The final concentrations (per liter) of reagents in the test were: 7.0 mmol of butyrylthiocholine iodide as the substrate, 50 mmol of phosphate buffer pH 7.7, and 0.25 mmol of 5,5-dithio-bis-(2)-nitrobenzoic acid. The procedure includes the addition of plasma sample (10 µL) to 1.5 mL of reaction solution containing the above reagents. The mixture was homogenized and the absorbance was measured at 405 nm, taking readings at 30 s intervals for 2 min. The quality control for BChE was carried out with commercial kit Standatrol S-E® Wiener.

2.5. Cotinine levels

The cotinine quantification in plasma samples was performed by HPLC–UV, following the method of Cattaneo *et al.* [30] after modifications. For this analysis, all individuals who smoked one or more cigarettes per day were excluded. The chromatographic equipment consisted of a chromatography system Agilent, 1100 series, and injector with loop of 20mL and UV–vis detector. The separation was achieved using a reverse-phase ZorbaxEclipse column XDB-C8 (4.6mm_150mm) Agilent with 5mm particle size. The mobile phase was a mixture of Milli-Q water:methanol:sodium acetate 0.1M:acetonitrile (50:15:25:10,v/v), 1 mL of citric acid 0.034 mol/L and 5.0 mL of

triethylamine for each liter of solution being added with pH 4.4, adjusted with acetic acid. The flow rate of 0.5 mL/min was maintained isocratically, eluent absorbance was monitored at 260nm and the total run time was 10min. As internal standard we used 2-phenylimidazole. The detection limit of method was 0.18ng/mL. For sample preparation a volume of 600 μ L of plasma was added to 25 μ L of NaOH 10 M and 25 μ L of internal standard (1mg/mL). Then, the extraction was performed with 5.0mL of dicloromethane was carried out by rotatory mixer for 40min and centrifuged at 3000g for 15min. The organic phase was totally dried under compressed air at ambient temperature. Next, 100 μ L of the mobile phase was added and 20 μ L was injected into the HPLC.

2.6. Statistical analysis

The normality of variables was evaluated by the Kolmogorov–Smirnov test. T-tests were used to compare the demographic characteristics of study populations. The statistical analyses of differences in DNA damage measured by Comet assay and MN measured by MN test were carried out using the non-parametric Mann Whitney *U*-Test for independent groups and non-parametric Wilcoxon Test for related samples. Spearman's test was used to analyze data correlations as appropriate. The critical level for rejection of the null hypothesis was considered to be a P value of 5%, two-tailed. All analyses were performed with the Prism 5.0 and SPSS/PC statistical software.

3. Results

The main demographic characteristics of the tobacco farmers and non-exposed group are presented in Table 1. Of the 60 individuals sampled, 30 reported working at different jobs (non-exposed group) and 30 reported working in tobacco farmwork (exposed group). Of these 30 non-exposed, 15 are males and 15 are females, and ranged in age from 21 to 69 years, with an average (\pm standard deviation) of 40.17 ± 13.02 . Of the 30 exposed, 17 are males and 13 are females, and ranged in age from 23 to 57 years, with an average (\pm standard deviation) of 42.10 ± 10.15 . No significant differences in average age were detected between the groups (t-test). The mean exposure time for the exposed group was 29.23 ± 12.83 years (time of experience in tobacco farming). No smoking in these groups. The Comet assay and MN test parameters analyzed are presented in Table 2.

The results showed a significant increase in Damage index and frequency in all different times in the tobacco crop, showing high values in the leaf harvest group ($P < 0.001$). DNA damage in males showed high values compared to females in every exposed group, however significant results were observed only in off-season group ($P < 0.05$). MN frequency increased was observed in the off-season group compared to non-exposed group ($P < 0.001$).

The Damage classes in the exposed and non-exposed group are shown in Figure 1. Class 0 and 1 were the main damage classes found.

The effect of age, exposure time and personal protective equipment (PPE) use on DNA damage is shown in Figures 2a, 2b, 2c, 2d and 3. No correlation was found between age and exposure time in relation to DNA damage observed in the Comet assay nor in relation Micronucleus test results (Spearman's test). No difference was seen either among the

group of farmers who said that they made complete or incomplete use of PPE (Mann-Whitney test).

Figures 4 and 5 show the distributions of serum cotinine and cholinesterase levels in different groups, respectively. Increase in cotinine level was observed in leaf harvest compared to non-exposed, off-season and pesticide application moments ($P < 0.05$). Cholinesterase (BChe) mean level was similar in the farmer and non-exposed group.

4. Discussion

The damaging health and environmental impacts of tobacco begin long before a cigarette is taken from a pack and lit. From the moment the tobacco seed is planted to the time it is harvested and cured, the health of those who cultivate the crop is in constant peril. Threats to health include the large amount of pesticides used on the tobacco crop as well as illnesses related to handling raw tobacco leaves [2].

In Brazil, tobacco farming includes different moments during the crop, repeated annually. According to Figure 6, the tobacco crops require most of the pesticide applications 30 to 150 days/year, the tobacco leaf harvest occurs 80 to 100 days/year, and then not much pesticide is used (leaf harvest), and during about the 100 days/year when tobacco leaves are sold and manipulation and pesticide application to the tobacco leaf is reduced (off-season). The farm workers included in this study said that they were exposed to the same pesticides shown in this figure, some of which are classified as hazardous by the World Health Organization, such as organophosphate, carbamate, dithiocarbamate, pyrethroid etc.

Beside these, tobacco farm workers are at risk of developing green tobacco sickness (GTS), a disease caused by skin absorption of nicotine from wet tobacco leaves [7,10].

Also, GTS has been linked to nicotine, and these symptoms have been attributed to acute nicotine poisoning following skin contact with mature tobacco plants. In our previous study with farm workers in Santa Cruz do Sul [31], during the exposure period, all these individuals presented symptoms related to pesticides and GTS, such as headache, abdominal pain, nausea, and vomiting.

Tobacco farmers during pesticides application were exposed to complex mixtures and significant higher values of DNA damage were found for the exposed group as compared to the unexposed group. These results were consistent with other reports [32-35]. Pesticide sprayers are the most frequently exposed group of agricultural workers, with positive findings obtained in 18 of 27 studies, presenting 1.12-7.67 higher exposure rates than other workers [4]. Workers employed in pesticide production and farmers who use pesticides have a higher risk of exposure and hence are more prone to the potential health effects of pesticides [36,37].

Biomarkers routinely used to assess pesticide exposure provide information regarding exposure at the time of sampling and are not likely to reflect exposures occurring even several days prior [38]. BChE inhibition is considered the primary mechanism responsible for the acute toxicity of organophosphate [38]. In our study, no significant difference in the activity of serum cholinesterase between non-exposed and worker subjects was found. Prior study of pesticide workers not identified an association between chronic exposure to organophosphate and BChE inhibition [39].

Our investigation demonstrated that PPE did not influence the results obtained by Comet assay and MN test, where no significant differences were shown between workers who declared that they had used complete protective clothing and those who did not or only used it incompletely. Controversial results are found in relation to PPE use and DNA

damage reduction. The use of mask and gloves seems to protect the workers by reducing the incidence of cytogenetic outcomes [40-42] and no difference in Comet assay and MN test results was shown in the group of farmers who wore no or only one kind of PPE during pesticide application [13,34]. In concordance with Da Silva *et al.* [34], during individual questionnaire application many participants did not inform the use of PPE correctly, and the extent of PPE use varied considerably. All the farmers knew the importance of using protective equipment, but many of them did not use all the items, mainly the mask due to difficulty in breathing.

The results showed a significant increase in Damage index and frequency in tobacco farmers compared to the non-exposed group, for all different crop times (Comet assay), with high values in the leaf harvest. The tobacco workers came into contact with green tobacco leaves and tobacco plants during the various tobacco cultivation processes and absorbed nicotine through the skin. In our study was observed that serum cotinine levels of tobacco farmers in leaf harvest moment were significantly increased, suggesting the absorption of nicotine from tobacco leaves.

The toxicity of nicotine depends on the amount of nicotine absorbed. There are a number of studies describing the acute health effects of nicotine toxicity in tobacco workers [9,43]. Genotoxic effects induced by tobacco leaves were investigated only in *Mus musculus*, where positive results were found [44]. However, research has shown that tobacco farmers are routinely exposed to complex mixtures of the compounds present in tobacco leaves, including organic and inorganic pesticides.

In the tobacco leaf harvest, besides nicotine in leaves, possibly pesticide residues were present. Moreover, some farm workers use pesticide during the leaf harvest, mainly glyphosate. Glyphosate-based compounds are broad-spectrum nonselective

organophosphate herbicides and the most extensively used worldwide [45]. Although the acute toxicity of glyphosate was considered low [46], glyphosate-based commercial formulations are generally more toxic than pure glyphosate [47] mainly due to the interference of surfactants such as polyethoxylene amine [48]. Human and mammal studies with pesticides, especially organophosphates, demonstrated that DNA damage and oxidative stress are mechanistically linked [33,49].

In addition, when DNA damage class frequency was separated, single strand break (classes 1 and 2) was more observed between damaged cells, and these can be more easily repaired than Class 4. There is evidence that metal ions present in some pesticides may interfere with distinct steps of different DNA repair systems and produce reactive oxygen species, leading to DNA oxidative damage [50] and that some organophosphates induce oxidative stress by ROS [51]. Nicotine has also been implicated in free radical generation in rodent and human cells of various types, directly addressing the relationship between ROS induction and the observed DNA damage [44,52,53].

Attenuation of the genotoxic effect in the off-season phase may not be seen in this study, differently from what was observed by Zeljezic and Garaj-Vrhovac [32] where workers who were later removed from the exposure zone presented a significant decrease in the Comet assay values. At this time a mutagenic effect was also noted. The increased genotoxic and mutagenic effect is probably due to exposure to pesticides and nicotine accumulated at the end of the harvest. A study conducted in vineyards workers from Serbia showed higher MN frequency compared to controls one month after the start of the spraying period, with a further increase at the end of the season [54]. Significant increases of MN associated with the duration of exposure were observed in the study carried out with sprayers from central Italy [55]. Furthermore, in off-season, many farmers stop

pesticide application and tobacco leaf manipulation because of the sale tobacco. Possibly some continue to apply pesticides to other crops. Besides, work showed that tobacco-specific nitrosamines are produced during curing of the tobacco leaf [56]. Hecht and Hoffmann [57] affirm that these nitrosamines are an important group of carcinogens in tobacco and tobacco smoke. Thus, tobacco farmers during separation of leaves process can be suffering tobacco-specific nitrosamines exposure.

As regards exposure time, no correlation was found to DNA damage and MNed cells. Our results were similar to Paiva *et al.* [35] where the levels of DNA strand breaks obtained, stratified for exposure time, were not statistically different for individuals of the rural communities, but differed significantly when compared to the control group. The results obtained in this study also did not show age effect in the DNA damage, according to others studies [13,34].

DNA damage in males showed high values compared to females in every exposed group, however significant results were observed only in off-season group. In tobacco farming the division of labor results in males having greater contact with the tobacco [5]. During the farming season, the average number of days spent by a person in South Brazil on tobacco farming-related activities (pesticide application and leaf harvest) is about 210 days. Females use to spend significantly less time on tobacco farming related activities than males, harvesting, priming, cropping and picking of the tobacco leaves. Males are involved in every phase of the tobacco crop, mainly intensive pesticide application.

This investigation calling attention to the significant increase in DNA damage during all different times in the tobacco crop, showing that the populations studied in this work suffers occupational chronic exposure and need to be constantly protecting your health. Finally, our findings indicate that tobacco farmers present DNA damage in blood cells,

suggesting a potential health risk. For farm workers who are already at risk for a number of work-related health problems and who suffer from other morbidity and mortality risks at rates higher than the general population, pesticide and nicotine exposure may add to this burden of disease and contribute to long term health problems. This investigation suggests that DNA damage increases at all tobacco crop stages, with special attention to the significant increase in the tobacco leaf harvest and off-season group. GTS appears during the tobacco harvest due to nicotine poisoning, therefore further study is necessary to identify DNA damage and GTS correlation. Considering that tobacco is grown in more than 100 countries and 25 producers account for 90% of global production, more aggressive worker protection regulations should be enacted.

Funding

Funding for this project was provided by the Brazilian Research Agency (CNPq), Conselho Nacional para o Desenvolvimento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

Acknowledgements

The authors thank the farmers who participated in this study, the Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS) and the Lutheran University of Brazil (ULBRA) for their support, as well as the Technical and Agricultural Assistance Extension Institute (EMATER, RS) for their collaboration.

References

1. Amorin, L. (2003) Biomarkers for evaluating exposure to chemical agents present in the environment. *Revista brasileira de epidemiologia*, **6**, 13.
2. NIOSH, A.H.S.C.N. (1996) Southeast Center Studies Ways to Prevent Green Tobacco Sickness.
3. Bull, S., Fletcher, K., Boobis, A.R. and Battershill, J.M. (2006) Evidence for genotoxicity of pesticides in pesticide applicators: a review. *Mutagenesis*, **21**, 93-103.
4. Bolognesi, C. (2003) Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. *Mutat Res*, **543**, 251-72.
5. Quandt, S.A., Arcury, T.A., Preisser, J.S., Norton, D. and Austin, C. (2000) Migrant farmworkers and green tobacco sickness: new issues for an understudied disease. *Am J Ind Med*, **37**, 307-15.
6. Gehlbach (1975) Nicotine absorption by workers harvesting green tobacco. *Lancet*, **1**, 478-80.
7. Arcury, T.A., Quandt, S.A., Preisser, J.S., Bernert, J.T., Norton, D. and Wang, J. (2003) High levels of transdermal nicotine exposure produce green tobacco sickness in Latino farmworkers. *Nicotine Tob Res*, **5**, 315-21.
8. Arcury, T.A., Vallejos, Q.M., Schulz, M.R., Feldman, S.R., Fleischer, A.B., Jr., Verma, A. and Quandt, S.A. (2008) Green tobacco sickness and skin integrity among migrant Latino farmworkers. *Am J Ind Med*, **51**, 195-203.
9. Schmitt, N.M., Schmitt, J., Kouimintzis, D.M. and Kirch, K. (2007) Health risks in tobacco farm workers—a review of the literature. *J Public Health*, **15**, 255-264.
10. Onuki, M., Yokoyama, K., Kimura, K., Sato, H., Nordin, R.B., Naing, L., Morita, Y., Sakai, T., Kobayashi, Y. and Araki, S. (2003) Assessment of urinary cotinine as a marker of nicotine absorption from tobacco leaves: a study on tobacco farmers in Malaysia. *J Occup Health*, **45**, 140-5.
11. Parikh, J.R., Gokani, V.N., Doctor, P.B., Kulkarni, P.K., Shah, A.R. and Saiyed, H.N. (2005) Acute and chronic health effects due to green tobacco exposure in agricultural workers. *American Journal of Industrial Medicine*, **47**, 494-499.
12. Falck, G.C.M., Hirvonen, A., Scarpato, R., Saarikoski, S.T., Migliore, L. and Norppa, H. (1999) Micronuclei in blood lymphocytes and genetic polymorphism for *GSTM1*, *GSTT1* and *NAT2* in pesticide-exposed greenhouse workers. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, **441**, 225-237.
13. Remor, A.P., Totti, C.C., Moreira, D.A., Dutra, G.P., Heuser, V.D. and Boeira, J.M. (2009) Occupational exposure of farm workers to pesticides: biochemical parameters and evaluation of genotoxicity. *Environ Int*, **35**, 273-8.
14. Khan, D.A., Bhatti, M.M., Khan, F.A., Naqvi, S.T. and Karam, A. (2008) Adverse effects of pesticides residues on biochemical markers in pakistani tobacco farmers. *Int J Clin Exp Med*, **1**, 274-82.
15. Singh, S., Kumar, V., Thakur, S., Banerjee, B.D., Chandna, S., Rautela, R.S., Grover, S.S., Rawat, D.S., Pasha, S.T., Jain, S.K., Ichhpujani, R.L. and Rai, A. (2011) DNA damage and cholinesterase activity in occupational workers exposed to pesticides. *Environ Toxicol Pharmacol*, **31**, 278-85.
16. Bolognesi, C., Parrini, M., Bonassi, S., Ianello, G. and Salanitto, A. (1993) Cytogenetic Analysis of a Human-Population Occupationally Exposed to Pesticides. *Mutation Research*, **285**, 239-249.

17. Da Silva, J., Moraes, C.R., Heuser, V.D., Andrade, V.M., Silva, F.R., Kvitko, K., Emmel, V., Rohr, P., Bordin, D.L., Andreazza, A.C., Salvador, M., Henriques, J.A. and Erdtmann, B. (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.
18. Fairbairn, D.W., Olive, P.L. and O'Neill, K.L. (1995) The comet assay: a comprehensive review. *Mutat Res*, **339**, 37-59.
19. Grover, P., Danadevi, K., Mahboob, M., Rozati, R., Banu, B.S. and Rahman, M.F. (2003) Evaluation of genetic damage in workers employed in pesticide production utilizing the Comet assay. *Mutagenesis*, **18**, 201-5.
20. 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**, 235-47.
21. Moller, P., Knudsen, L.E., Loft, S. and Wallin, H. (2000) The comet assay as a rapid test in biomonitoring occupational exposure to DNA-damaging agents and effect of confounding factors. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, **9**, 1005-1015.
22. Carrano, A.V. and Natarajan, A.T. (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.
23. Hoffmann, H., Hogel, J. and Speit, G. (2005) The effect of smoking on DNA effects in the comet assay: a meta-analysis. *Mutagenesis*, **20**, 455-66.
24. Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R. and Schneider, E.L. (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*, **175**, 184-91.
25. Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C. and Sasaki, Y.F. (2000) Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen*, **35**, 206-21.
26. Nadin, S.B., Vargas-Roig, L.M. and Ciocca, D.R. (2001) A silver staining method for single-cell gel assay. *J Histochem Cytochem*, **49**, 1183-6.
27. Collins, A.R. (2004) The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol*, **26**, 249-61.
28. Fenech, M. (1993) The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutat Res*, **285**, 35-44.
29. Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Jr. and Feather-Stone, R.M. (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*, **7**, 88-95.
30. Cattaneo, R., Alegretti, A.P., Sagebin, F.R., Abreu, C.M.d., Petersen, G.O., Chatkin, J.M. and Thiesen, F.V. (2006) Validation of a high-performance liquid chromatography method for the determination of cotinine in urine. *Revista brasileira de toxicologia*, **19**, 25-31.
31. Alves, J., Silva, F.R., Salvador, M., Kvitko, K., Rohr, P., Henriques, J.A.P. and da Silva, J. (*in preparation*) Occupational Exposure and Evaluation of genotoxicity in tobacco farmers.

32. Garaj-Vrhovac, V. and Zeljezic, D. (2001) Cytogenetic monitoring of croatian population occupationally exposed to a complex mixture of pesticides. *Toxicology*, **165**, 153-62.
33. Muniz, J.F., McCauley, L., Scherer, J., Lasarev, M., Koshy, M., Kow, Y.W., Nazar-Stewart, V. and Kisby, G.E. (2008) Biomarkers of oxidative stress and DNA damage in agricultural workers: a pilot study. *Toxicol Appl Pharmacol*, **227**, 97-107.
34. Da Silva, J., Moraes, C.R., Heuser, V.D., Andrade, V.M., Da Silva, F.R., Kvitko, K., Emmel, V., Rohr, P., Bordin, D.L., Andrezza, A.C., Salvador, M., Henriques, J.A. and Erdtmann, B. (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.
35. Paiva, J.C., Cabral, I.O., Soares, B.M., Sombra, C.M., Ferreira, J.R., Moraes, M.O., Cavalcanti, B.C. and Pessoa, C. (2011) Biomonitoring of rural workers exposed to a complex mixture of pesticides in the municipalities of Tiangua and Ubajara (Ceara state, Brazil): Genotoxic and cytogenetic studies. *Environ Mol Mutagen*.
36. Sailaja, N., Chandrasekhar, M., Rekhadevi, P.V., Mahboob, M., Rahman, M.F., Vuyyuri, S.B., Danadevi, K., Hussain, S.A. and Grover, P. (2006) Genotoxic evaluation of workers employed in pesticide production. *Mutat Res*, **609**, 74-80.
37. Bolognesi, C., Creus, A., Ostrosky-Wegman, P. and Marcos, R. (2011) Micronuclei and pesticide exposure. *Mutagenesis*, **26**, 19-26.
38. Rohlman, D.S., Anger, W.K. and Lein, P.J. (2011) Correlating neurobehavioral performance with biomarkers of organophosphorous pesticide exposure. *Neurotoxicology*, **32**, 268-76.
39. Shadnia, S., Azizi, E., Hosseini, R., Khoei, S., Fouladdel, S., Pajoumand, A., Jalali, N. and Abdollahi, M. (2005) Evaluation of oxidative stress and genotoxicity in organophosphorus insecticide formulators. *Hum Exp Toxicol*, **24**, 439-45.
40. Lander, F. and Ronne, M. (1995) Frequency of sister chromatid exchange and hematological effects in pesticide-exposed greenhouse sprayers. *Scand J Work Environ Health*, **21**, 283-8.
41. Dulout, F.N., Pastori, M.C., Olivero, O.A., Gonzalez Cid, M., Loria, D., Matos, E., Sobel, N., de Bujan, E.C. and Albiano, N. (1985) Sister-chromatid exchanges and chromosomal aberrations in a population exposed to pesticides. *Mutat Res*, **143**, 237-44.
42. Shaham, J., Kaufman, Z., Gurvich, R. and Levi, Z. (2001) Frequency of sister-chromatid exchange among greenhouse farmers exposed to pesticides. *Mutat Res*, **491**, 71-80.
43. Oliveira, P.P.V., B., S.C., Moura, L., Malta, D.C., Torres, M.C.A., Lima, S.M.C.P., Lima, A.L.A., Leite, C.E., Costa-e-Silva, V.L., Sobel, J. and Lanzieri, T.M. (2010) First reported outbreak of green tobacco sickness in Brazil. *Caderno de Saúde Pública*, **26**, 2263-2269.
44. Da Silva, F.R., Erdtmann, B., Dalpiaz, T., Nunes, E., Da Rosa, D.P., Porawski, M., Bona, S., Simon, C.F., Da, C.A.M. and Da Silva, J. (2010) Effects of dermal exposure to *Nicotiana tabacum* (Jean Nicot, 1560) leaves in mouse evaluated by multiple methods and tissues. *J Agric Food Chem*, **58**, 9868-74.
45. Cavalcante, D.G., Martinez, C.B. and Sofia, S.H. (2008) Genotoxic effects of Roundup on the fish *Prochilodus lineatus*. *Mutat Res*, **655**, 41-6.

46. Li, A.P. and Long, T.J. (1988) An evaluation of the genotoxic potential of glyphosate. *Fundam Appl Toxicol*, **10**, 537-46.
47. Peixoto, F. (2005) Comparative effects of the Roundup and glyphosate on mitochondrial oxidative phosphorylation. *Chemosphere*, **61**, 1115-22.
48. Tsui, M.T. and Chu, L.M. (2008) Environmental fate and non-target impact of glyphosate-based herbicide (Roundup) in a subtropical wetland. *Chemosphere*, **71**, 439-46.
49. Lodovici, M., Casalini, C., Briani, C. and Dolara, P. (1997) Oxidative liver DNA damage in rats treated with pesticide mixtures. *Toxicology*, **117**, 55-60.
50. Videla, L.A., Fernandez, V., Tapia, G. and Varela, P. (2003) Oxidative stress-mediated hepatotoxicity of iron and copper: role of Kupffer cells. *Biometals*, **16**, 103-11.
51. Guilherme, S., Gaivao, I., Santos, M.A. and Pacheco, M. (2010) European eel (*Anguilla anguilla*) genotoxic and pro-oxidant responses following short-term exposure to Roundup--a glyphosate-based herbicide. *Mutagenesis*, **25**, 523-30.
52. Yildiz, D., Liu, Y.S., Ercal, N. and Armstrong, D.W. (1999) Comparison of pure nicotine- and smokeless tobacco extract-induced toxicities and oxidative stress. *Arch Environ Contam Toxicol*, **37**, 434-9.
53. Wetscher, G.J., Bagchi, M., Bagchi, D., Perdakis, G., Hinder, P.R., Glaser, K. and Hinder, R.A. (1995) Free radical production in nicotine treated pancreatic tissue. *Free Radic Biol Med*, **18**, 877-82.
54. Joksic, G., Vidakovic, A. and Spasojevic-Tisma, V. (1997) Cytogenetic monitoring of pesticide sprayers. *Environ Res*, **75**, 113-8.
55. Pasquini, R., Scassellati-Sforzolini, G., Angeli, G., Fatigoni, C., Monarca, S., Beneventi, L., DiGiulio, A.M. and Bauleo, F.A. (1996) Cytogenetic biomonitoring of pesticide-exposed farmers in central Italy. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, **15**, 29-39.
56. Andersen, R.A. and Kemp, T.R. (1985) Accumulation of 4-(N-methyl-N-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in alkaloid genotypes of burley tobacco during postharvest processing: comparisons with N'-nitrosornicotine and probable nitrosamine precursors. *Cancer Res*, **45**, 5287-93.
57. Hecht, S.S. and Hoffmann, D. (1988) Tobacco-specific nitrosamines, an important group of carcinogens in tobacco and tobacco smoke. *Carcinogenesis*, **9**, 875-84.
58. Almeida, G.E.G. (2005) Fumo: servidão moderna e violação de direitos humanos. *Curitiba: Terra de Direitos*, 168.

Table 1: Demographic characteristics of the study population with respect to sex, age, smoking and years of exposure.

Parameters	Non-exposed	Exposed
Number of subjects	30	30
Males	15	17
Females	15	13
Age (mean±S.D.)	40.17 ± 13.02	42.10 ± 10.15
Years of exposure (mean±S.D)	-	29.23 ± 12.83

S.D. = standard deviation

Table 2: Mean values (mean±standard deviation) obtained by the genotoxicity and mutagenicity parameters analyzed.

Groups	Comet assay in 100 leukocytes		MN in 2000 binucleated lymphocytes (n)
	Damage index (n)	Damage frequency (n)	
<i>Non-exposed</i>			
Total	8.07 ± 7.47 (30)	4.97 ± 4.76 (30)	6.19 ± 3.55 (29)
Female	7.87 ± 4.01 (15)	4.53 ± 3.87 (15)	6.13 ± 3.66 (15)
Male	8.27 ± 7.79 (15)	5.40 ± 5.62 (15)	5.15 ± 4.16 (14)
<i>Exposed</i>			
Off-season			
Total	14.53 ± 13.98* (30)	10.57 ± 7.83** (30)	9.54 ± 2.96 ^{c,***} (28)
Female	10.23 ± 12.12 (13)	7.77 ± 7.17 (13)	9.25 ± 2.93 (13)
Male	17.82 ± 14.74 ^a (17)	12.71 ± 7.84 ^a (17)	9.92 ± 3.09 ^c (15)
Pesticide application			
Total	15.24 ± 12.78* (25)	8.76 ± 6.15* (25)	8.88 ± 5.30 (17)
Female	10.75 ± 8.01 (12)	6.67 ± 4.96 (12)	8.14 ± 2.79 (8)
Male	19.38 ± 15.13 (13)	10.69 ± 6.68 (13)	10.25 ± 6.73 (9)
Leaves harvest			
Total	17.59 ± 10.23 ^{***} (22)	13.59 ± 7.63 ^{b, ***} (22)	5.76 ± 3.11 (21)
Female	16.44 ± 11.37 (9)	13.22 ± 9.43 (9)	5.17 ± 3.04 (12)
Male	18.38 ± 9.76 (13)	13.85 ± 6.50 (13)	6.50 ± 3.42 (9)

Significant in relation to non-exposed group *P<0.05, **P<0.01 and ***P<0.001

^a Significant in relation to female of the same group (P<0.05)

^b Significant in relation to pesticide application group P<0.05

^c Significant in relation to leaves harvest group P<0.01

n= number of individuals, Mann-Whitney U-test/ Wilcoxon test

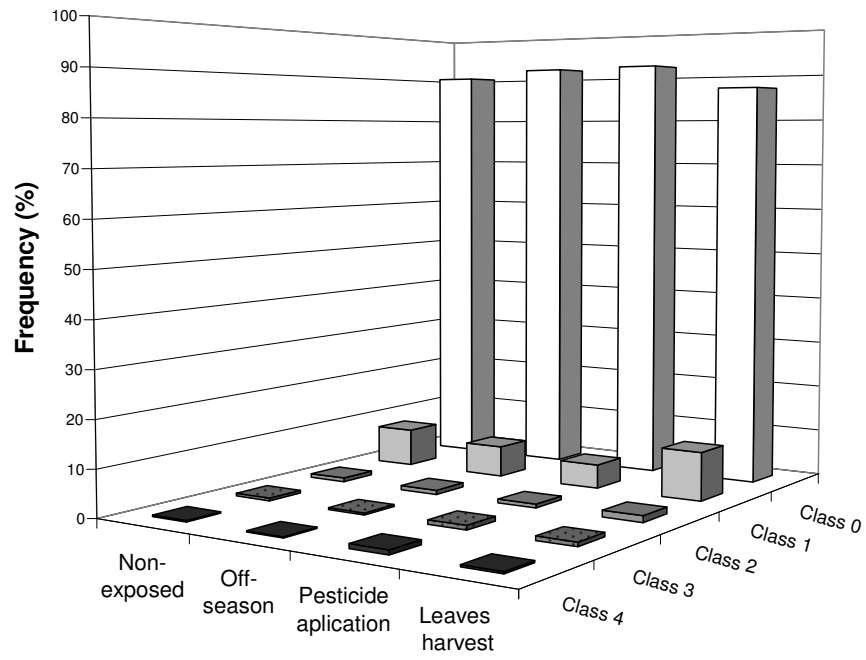


Figure 1: Distribution of damaged cells in Comet assay into damaged classes (grade 0–4) at different exposure phases of the tobacco farmers and the non-exposed group.

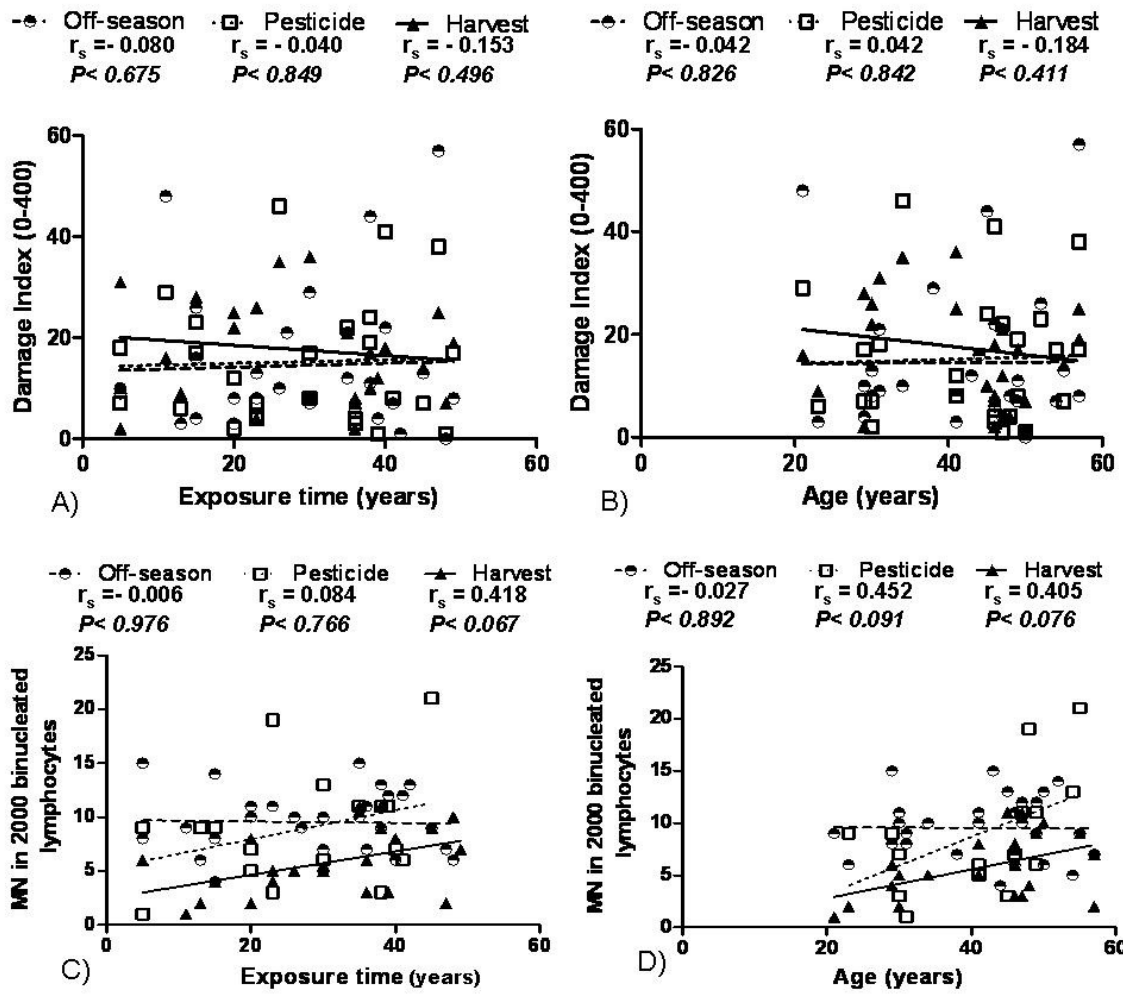


Figure 2: Correlation of the DNA damage with exposure time (A) and age (B); and correlation of MN frequency with exposure time (C) and age (D) (Spearman's test).

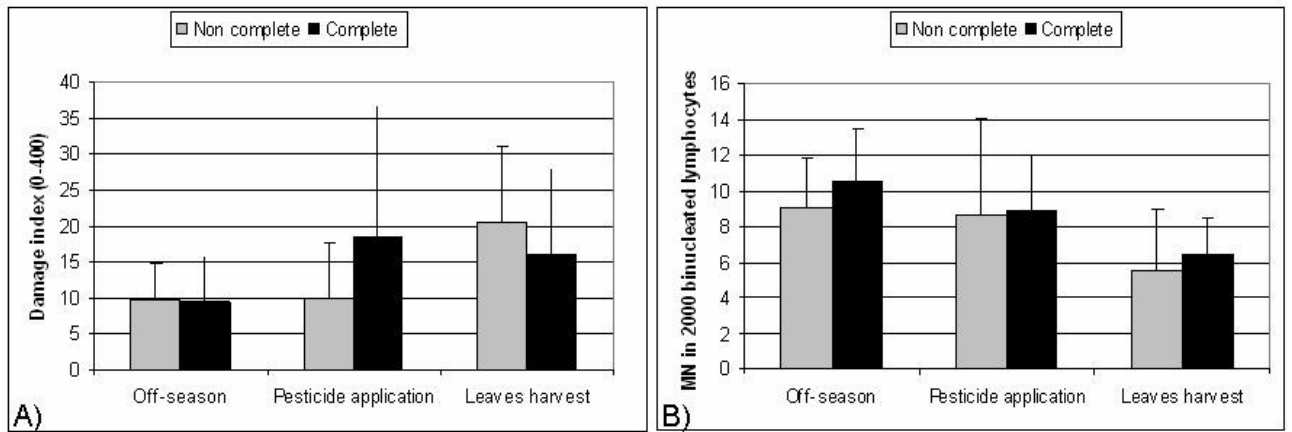


Figure 3: Mean and standard deviation of A) damage index and B) MN frequency of individuals using non-complete and complete personal protective equipment (Mann Whitney test).

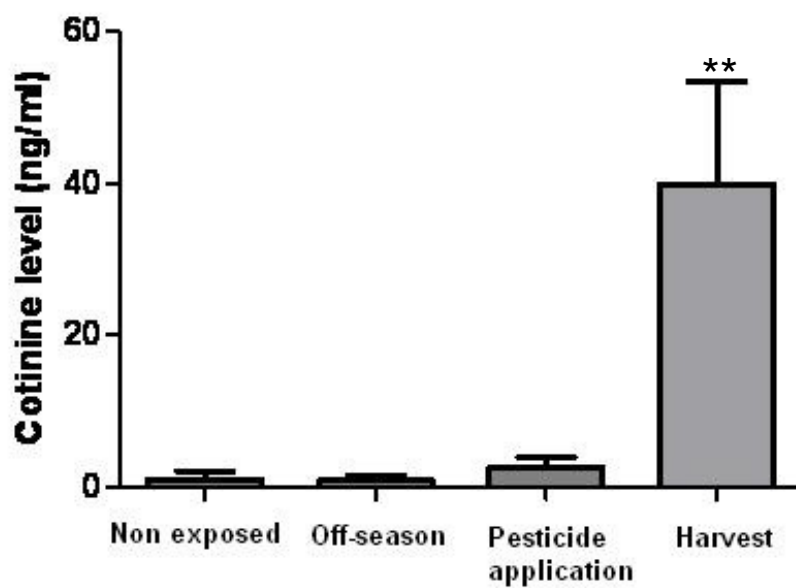


Figure 4: Concentrations of cotinine (ng/ml) in the serum blood samples of tobacco farmers and non-exposed individuals (Mann Whitney test/Wilcoxon test).

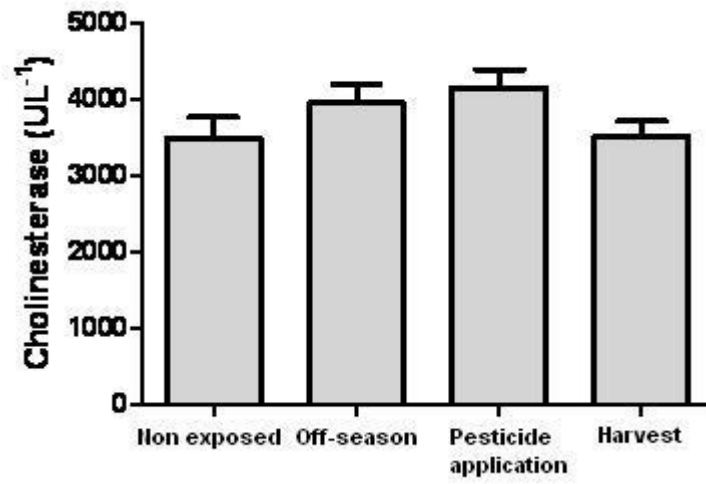


Figure 5: Concentrations of cholinesterase (UL⁻¹) in the serum blood samples of tobacco farmers and non-exposed individuals (Paired and unpaired t-test).

Vegetative cycle and mains agrochemicals used in greenhouse tobacco crop in Brazil

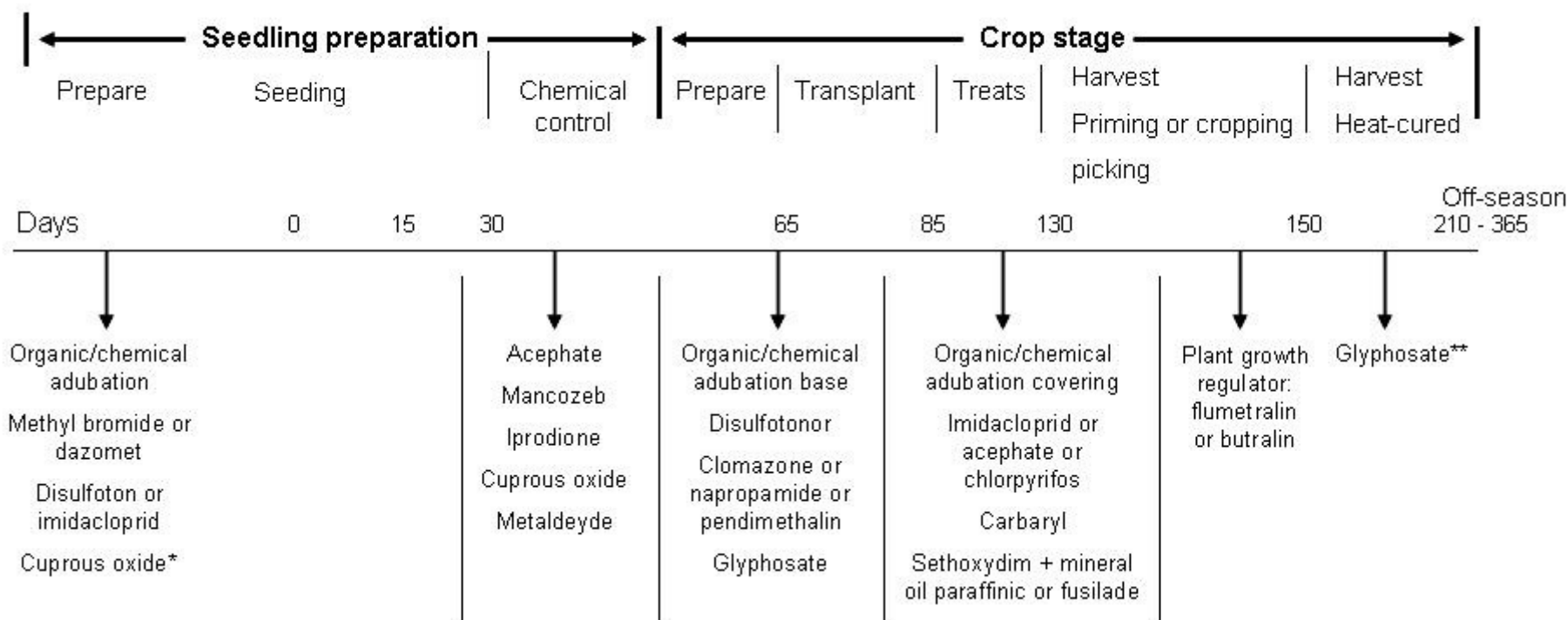


Figure 6: Vegetative cycle and mains agrochemicals used in greenhouse tobacco crop in Brazil. * Specific product for the Float System;

**Only in high regions. Reference: Lima (2000) *apud* Almeida, GEG [58].

CAPÍTULO III

Buccal Micronucleus Cytome Assay and Genetic Polymorphism for *PON1Gln192Arg* and *CYP2A6*9(-48T>G)* in Biomonitoring Tobacco Farmers

Fernanda Rabaioli Da Silva^a, Juliana Da Silva^{b,*}, Emilene Nunes^b, Danieli Benedetti^b, Vivian Kahl^b, Paula Rohr^a, Marina B. Abreu^c, Flávia Valladão Thiesen^c, Kátia Kvitko^{a,*}

^a Postgraduate Program in Genetics and Molecular Biology (PPGBM), Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre-RS, Brazil

^b Laboratory of Genetic Toxicology, Postgraduate Program in Genetic and Applied Toxicology (PPGGTA), Lutheran University of Brazil (ULBRA), Canoas-RS, Brazil

^c Toxicology Institute, Catholic Pontifical University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

*Corresponding authors:

Kátia Kvitko, Departamento de Genética e Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil. E-mail: katia.kvitko@ufrgs.br

Juliana da Silva, Universidade Luterana do Brasil, ULBRA, Av. Farroupilha 8001, Prédio 1, Sala 122; 92425-900; Canoas, RS, Brazil. E-mail: juliana.silva@ulbra.br

Artigo a ser submetido à Environmental & Molecular Mutagenesis

Abstract

Tobacco is an important Brazilian cash crop and huge amounts of pesticides are being used to control insect growth. Workers come into contact with green tobacco leaves during the tobacco harvest, and absorb nicotine through the skin. Dermal absorption of nicotine can cause a syndrome called Green Tobacco Sickness. Genomic instability, cell death and frequency of basal cells by buccal micronucleus cytome assay (BMNcyt) as well as enzyme (cholinesterase and nicotine) levels in the blood of tobacco farmers were investigated. In order to verify the relationship between genetic susceptibility and biomarker results, *PON1*Gln192Arg e *CYP2A6**9(-48T>G) polymorphisms were evaluated. Peripheral blood and buccal cell samples were collected from 106 agricultural workers, at two different crop times (during pesticide application and leaf harvest), and 53 were non-exposed. Results show nuclear anomalies in the buccal cells in tobacco farmers exposed to a mixture of the substances with genotoxic and cytotoxic potential. Difference in BMNcyt assay results was found between two different times in the tobacco crop. Effects of *PON1*Gln192Arg and *CYP2A6**9(-48T>G) genetic polymorphisms on the modulation of DNA damage induced by pesticides and cell death were observed. An increased cotinine level was observed in the leaf harvest compared to the non-exposed group. The cholinesterase (BChe) level was similar among the farmers and in the non-exposed group. No significant effect on BChE activity and cotinine level was observed in the exposed group for different *PON1* and *CYP2A6* genotypes, respectively. Thus, effective intervention strategies addressing the specific needs of tobacco farmers in different regions around the world must be developed, evaluated and further improved.

Key words: Buccal micronucleus cytome assay, tobacco farmers, pesticides, nicotine, genetic polymorphism

1. Introduction

Tobacco plants require a very large amount of pesticides (insecticides, herbicides, fungicides and plant growth regulators) to protect them from insects and disease. The heavy and repeated use of pesticides takes a toll on tobacco farmers, many of whom are unaware of the proper safety procedures necessary to handle these chemicals (NIOSH 1996). Organophosphate and carbamate are the principal chemical class of pesticide used by tobacco farmers. Many of these pesticides act as anticholinesterase (anti-Che) agents (Ntow *et al.* 2009). Because of the specificity of this relationship, depression of cholinesterase (Che) activity has been used as a biomarker of exposure to these classes of pesticides in farmers (Shadnia *et al.* 2005; Hernandez *et al.* 2005; Khan *et al.* 2008; Khan *et al.* 2010; Rohlman *et al.* 2011; Singh *et al.* 2011a), including tobacco farmers (Panemangalore *et al.* 1999). In addition, these workers come into contact with green tobacco leaves during the tobacco harvest, and in this way absorb nicotine through the skin. Many studies have documented the increase of cotinine (a nicotine metabolite) in tobacco workers (Onuki *et al.* 2003; Arcury *et al.* 2003; Parikh *et al.* 2005; Arcury *et al.* 2008). Studies have estimated that dermal absorption of nicotine results in the characteristic green tobacco sickness (GTS), an occupational illness reported by tobacco workers worldwide (Arcury *et al.* 2003; Arcury *et al.* 2008). Thus, agricultural workers engaged in tobacco cultivation are constantly exposed to a large amount of pesticides as well as to nicotine present in raw tobacco leaves. All these compounds can generate DNA damage (Da Silva *et al.* 2010).

Biomonitoring studies using Micronucleus test in peripheral blood lymphocytes from human populations exposed to pesticides show negative (Ramirez and Cuenca 2001; Pastor *et al.* 2002; Pastor *et al.* 2003) and positive results (Costa *et al.* 2007; Ali *et al.* 2008; Da

Silva *et al.* 2008), however, cell types that repair DNA damage less efficiently are likely to show higher levels of residual damage than cells proficient in DNA repair (Singh *et al.* 1990). Buccal cells have been shown to have limited DNA repair capacity relative to peripheral blood lymphocytes, and therefore may more accurately reflect genomic instability events in epithelial tissues (Dhillon *et al.* 2004; Thomas *et al.* 2009). Furthermore, the micronucleus (MN) assay with exfoliated buccal cells is cost effective and non invasive method.

The individual response to environmental and occupational exposures may vary according to various conditions such as the functioning of the particular gene combination, the absorption and metabolism rate of genotoxic agents, cell death (apoptosis/necrosis) (Iarmarcovai *et al.* 2008). Some studies have demonstrated the relationship between genetic susceptibility and biomarkers in occupationally exposed populations (Hernandez *et al.* 2005; Heuser *et al.* 2007; Da Silva *et al.* 2008; Rohr *et al.* 2011). Paraoxonase-1 (PON1) is the serum enzyme responsible for the metabolism of chemical compounds belonging to the organophosphate class, and “unfavorable” alleles could increase the body load of reactive mutagenic agents in exposed individuals (Au *et al.* 1998; Au *et al.* 1999; Bolognesi 2003; Da Silva *et al.* 2008; Singh *et al.* 2011b). Human cytochrome P450 2A6 (CYP2A6) constitutes the main P450 involved in the C-oxidation of nicotine to cotinine (Messina *et al.* 1997) as well as in the further conversion of cotinine to different metabolites (Nakajima *et al.* 1996), and large interindividual differences are seen in the levels of this enzyme, to a great extent caused by the distribution of several different polymorphic gene variants (Pitarque *et al.* 2001).

Tobacco field workers are exposed to pesticides and plant-growth inhibitors that are sprayed on the plants to prevent infestation and regulate shoot growth; nicotine exposure

could be significant as this chemical is absorbed through the skin from wet tobacco leaves (Ballard *et al.* 1995). Therefore, we investigated genomic instability, cell death and frequency of basal cells by buccal micronucleus cytome assay as well as enzymes levels (BChe and nicotine) in the blood of tobacco farmers who were exposed to a combination of pesticides, growth regulator, and nicotine. In order to verify the relationships between genetic susceptibility and buccal cytome and biochemical results in tobacco field workers, *PONI* and *CYP2A6**9 polymorphisms were evaluated.

2. Methods

2.1. Study population and sample collection

This study was approved by the Committee on Research Ethics of UFRGS, and written informed consent was obtained from each individual before the research began.

Subjects from Venâncio Aires and Santa Cruz do Sul (in the northeast region of the state of Rio Grande do Sul, southern Brazil) were sampled from July (2008) to February (2010). The study involved a total of 159 individuals, 53 non-exposed and 106 exposed. Buccal cell samples were collected at two different times in the tobacco crop (at an interval of about five months): pesticide application (a total of 102 individuals evaluated) and leaf harvest (85 individuals). The buccal cells were also collected from a non-exposed group. The non-exposed individuals were office employees living in the same region as the exposed individuals.

All individuals in the study were asked to answer a Portuguese-language version of a questionnaire from the International Commission for Protection against Environmental Mutagens and Carcinogens (Carrano and Natarajan 1988) and to participate in a face-to-face interview, which included standard demographic data (age, gender, etc.), as well as

questions concerning medical issues (exposure to X-rays, vaccinations, medication, etc.), life style (smoking, coffee and alcohol consumption, diet, etc.) and occupation (number of working hours per day, time exposed to pesticide, pesticide application duration, pesticide type, protective measures adopted (PPE), etc. In all groups, individuals who smoked more than twenty cigarettes per day for at least 1 year were considered smokers (Hoffmann *et al.* 2005).

2.2. Buccal micronucleus cytome assay (BMNCyt assay)

Buccal cell samples were obtained by gently rubbing the inside of the cheeks (right and left side) with a cytobrush, which was immersed in 5ml of cold saline (0.9% (w/v) aqueous NaCl) in a conical tube and transported under refrigeration to the laboratory where the saline was centrifuged at 1500 rpm for 8min and the sedimented buccal cells washed twice more with saline and once more with Carnoy's fixative (methanol and glacial acetic acid 3:1) under the same centrifugation conditions. The cell suspension was dropped onto a slide and allowed to air-dry. The slides were stained with 2% Giemsa solution for 10min, rinsed in distilled water and air-dried. For each individual, the frequency of the various cell types in the assay are represented as the number of cells in a 2,000 as suggested by Thomas *et al.* (2009).

2.3. Plasma cholinesterase activity

The measurement of butyrylcholinesterase (BChE) activity was determined by continuous assay using a kit produced by Wiener Laboratory®, which is based on the Ellman *et al.* (1961) method, and resulting absorbances were measured with a B442® Micronal spectrophotometer. The final concentrations (per liter) of reagents in the test were:

7.0mmol of butyrylthiocholine iodide as the substrate, 50mmol of phosphate buffer pH 7.7, and 0.25mmol of 5,5-dithio-bis-(2)-nitrobenzoic acid. The procedure includes the addition of plasma sample (10 μ L) to 1.5mL of reaction solution containing the above reagents. The mixture was homogenized and the absorbance was measured at 405nm, taking readings at 30s intervals for 2min. The quality control for BChE was carried out with commercial kit Standatrol S-E[®] Wiener.

2.4. Cotinine levels

The cotinine quantification in plasma samples was performed by HPLC–UV, following the method of Cattaneo *et al.* (2006) after modifications. For this analysis, all individuals who smoked one or more cigarettes per day were excluded. The chromatographic equipment consisted of a chromatography system Agilent, 1100 series, and injector with loop of 20mL and UV–vis detector. The separation was achieved using a reverse-phase ZorbaxEclipse column XDB-C8 (4.6mm_150mm) Agilent with 5mm particle size. The mobile phase was a mixture of Milli-Q water:methanol:sodium acetate 0.1M:acetonitrile (50:15:25:10,v/v), 1 mL of citric acid 0.034 mol/L and 5.0 mL of triethylamine for each liter of solution being added with pH 4.4, adjusted with acetic acid. The flow rate of 0.5 mL/min was maintained isocratically, eluent absorbance was monitored at 260nm and the total run time was 10min. As internal standard we used 2-phenylimidazole. The detection limit of method was 0.18ng/mL. For sample preparation a volume of 600 μ L of plasma was added to 25 μ L of NaOH10 M and 25 μ L of internal standard (1mg/mL). Then, the extraction was performed with 5.0mL of dicloromethane was carried out by rotatory mixer for 40min and centrifuged at 3000g for 15min. The

organic phase was totally dried under compressed air at ambient temperature. Next, 100 μ L of the mobile phase was added and 20 μ L was injected into the HPLC.

2.5. Genotyping

2.5.1. *PON1Gln192Arg* Polymorphism

The *PON1Gln192Arg* polymorphism (location: 7q21.3) was genotyped by PCR/RFLP, according to the description by Humbert *et al.* (1993). An aliquot of the PCR product was digested with *AlwI*, and the genotypes were resolved using an agarose gel (3%) stained with ethidium bromide.

2.5.2. *CYP2A6*9* (-48T>G) Polymorphism

The *CYP2A6*9* (-48T>G) polymorphism was genotyped by allele-specific PCR two-step using the method developed by Schoedel *et al.* (2004). The genotypes were resolved using an agarose gel (3%) stained with ethidium bromide.

2.6. Statistical analysis

The normality of variables was evaluated by the Kolmogorov–Smirnov test. T-tests were used to compare the demographic characteristics of study populations. The statistical analysis of differences in BMNCyt assay results was carried out using the non-parametric Mann Whitney (for independent samples) or Wilcoxon Test (for correlated samples). The statistical analysis of differences in the nicotine and BChE levels was carried out using paired (for correlated samples) and unpaired (for independent samples) t-test. Allelic frequencies were estimated by gene counting. For comparisons among allelic and genotype frequencies and agreement of genotypic frequencies with Hardy–Weinberg expectations

the χ^2 or Fisher's exact test was employed, using the INSTAT software program. The critical level for rejection of the null hypothesis was considered to be a P value of 5%, two-tailed. All analyses were performed with the SPSS/PC statistical software.

3. Results

Of the 159 individuals sampled, 53 reported working at different jobs (non-exposed group) and 106 reported working in tobacco farms (exposed group). Of these 53 non-exposed, 19 are males and 34 are females, and ranged in age from 21 to 82 years, with an average (\pm standard deviation) of 41.93 ± 13.55 . Of the 106 exposed, 62 are males and 44 are females, and ranged in age from 21 to 85 years, with an average (\pm standard deviation) of 42.33 ± 13.88 . No significant differences in average age were detected between the groups (t-test). The mean exposure time for the exposed group was 30.34 ± 15.35 years. These results are illustrated in Table I. The BMNCyt assay was used to identify biomarkers for DNA damage, cell death and basal cell frequency in buccal cells of non-exposed and exposed group at two different times in the tobacco crop (at an interval of about five months): pesticide application and leaf harvest (Table II).

Proliferative potential evaluation of epithelial cells revealed a higher frequency of basal cells in individuals exposed (pesticide application - $P < 0.05$ and leaf harvest - $P < 0.01$ – Mann Whitney test) than in the non-exposed and in the leaf harvest group compared to pesticide application ($P < 0.001$ – Wilcoxon test). DNA damage was observed in basal cells, exposed groups had a significantly elevated micronuclei frequency compared to non-exposed group ($P < 0.01$), where the moment of pesticide application shows a higher micronucleus frequency than the moment of the leaf harvest.

Comparing DNA damage and cytokinetic defects in differentiated cells, exposed groups had a significantly elevated micronuclei frequency in comparison with the non-exposed group ($P < 0.01$) and in pesticide application compared to the leaf harvest group ($P < 0.001$). The frequency of nuclear buds and binucleated cells was significantly higher in the exposed groups than in the non-exposed group ($P < 0.01$ and $P < 0.05$, respectively), however higher binucleated frequency was observed in the leaf harvest group ($P < 0.001$).

Cell death evaluation found a higher frequency of condensed chromatin cells in the pesticide application group than in the leaf harvest group ($P < 0.001$). The number of pyknotic cells in leaf harvest group was elevated compared to pesticide application and non-exposed groups ($P < 0.001$ and $P < 0.01$, respectively). Karyorrhectic cell frequency was higher in the exposed groups than in the non-exposed group ($P < 0.001$) and in the leaf harvest group compared to pesticide application group ($P < 0.001$). The number of karyolytic cells was higher in the exposed groups than in the non-exposed group ($P < 0.01$) and in pesticide application compared to the leaf harvest group ($P < 0.001$). No statistically significant difference was found between genders and between smokers and non-smokers and no correlation was found with age for the BMNCyt assay results (*data not show*).

The genotype and allelic frequencies of the genes studied for the non-exposed and exposed groups are shown in Table III, indicating no deviation from Hardy–Weinberg expectations (Chi-square test). The variant allele frequencies (Table III, in bold) did not differ statistically between the two groups for polymorphisms studied. The frequency of genotypes detected in our study are similar to those previously described by Da Silva *et al.* (2008) for the *PON1Gln192Arg* polymorphism and by Vasconcelos *et al.* (2005) for the and *CYP2A6*9(-48T>G)* polymorphism.

Table IV demonstrates the effect of individual genotypes on different results of the BMNCyt assay evaluated in the exposed and non-exposed groups. In pesticide application group *PON Gln/Gln* individuals show increased basal micronucleated cells as compared to *PON Arg/-* individuals ($P < 0.05$, Mann–Whitney test). The polymorphism for the *CYP2A6* gene influenced karyolytic cells in the leaf harvest group, where *CYP2A6*9/-* individuals shown an increase as compared to *CYP2A6*1/*1* ($P < 0.05$; Mann–Whitney test).

Figures 1 and 2 shows the distributions of serum cotinine and BChE levels in non-exposed and exposed groups, respectively. Increase in cotinine level was observed in leaf harvest compared to non-exposed group ($P < 0.05$). The mean level of BChE was similar in the farmer and non-exposed group. No significant effect on the BChE activity and cotinine level was observed in the exposed group with reference to different *PON1* and *CYP2A6* genotypes, respectively (Figure 3a e 3b).

4. Discussion

This study was based on differences in the cellular and nuclear morphology utilized to identify the potential biomarkers associated with DNA damage, chromosomal instability, cell death and regenerative potential in tobacco farmers exposed to pesticide and nicotine (during harvest time) compared to non-exposed individuals.

Since DNA damage and cell death are considered the prime mechanisms during chemical carcinogenesis, data may be relevant to risk assessment on protecting human health and preventing carcinogenesis (Diler and Celik 2011). Results obtained from buccal cells showed statistically significant increases in micronuclei, nuclear buds, binucleated cells amongst exposed subjects in differentiated cells and in micronuclei in basal cells. Micronuclei are formed mainly from chromatids or chromosome fragments, which remain

excluded from the main cell nucleus (Holland *et al.* 2008), indicating an increased risk of cancer (He *et al.* 2000). Other authors have found an increased micronuclei frequency in pesticide-exposed populations (Ergene *et al.* 2007; Bortoli *et al.* 2009).

Buccal cells are in constant contact with the environment, which suggests that oral epithelium is an important target site for inhaled toxicants; therefore, it is reasonable to expect that they would exhibit higher evidence of genotoxicity in pesticide application (higher micronucleus frequency in differentiated and basal cells) compared to the leaf harvest group, due to the use of sprayed pesticide. The presence of nuclear bud cells was more frequent in the exposed group. The mechanism triggering nuclear bud formation is unknown but may be related to the elimination of amplified DNA or DNA repair complexes (Shimizu *et al.* 2005). Binucleated cells were also found to be more frequent in the exposed group. The precise significance of these cells is not known but they may be indicative of cytokinesis failure following the last nuclear division. As shown in a study involving the BMNcyt assay in Down Syndrome (Thomas *et al.* 2008), the binucleate/mononucleate ratio could be an important biomarker for identifying individuals with cytokinesis failure caused by higher than normal rates of aneuploidy. Alteration in the number of chromosomes, defined as aneuploidy, stands out as a consistent marker of malignancy (Sanchez-Siles *et al.* 2011). In a few *in vivo* studies measuring chromosomal alterations, nicotine has been reported to interfere with chromosome disjunction (Racowsky *et al.* 1989) and to induce aneuploidy and polyploidy in mouse bone-marrow cells (Bishun *et al.* 1972). Therefore, possibly the leaf harvest group showed binucleated cell frequency increased in relation to the pesticide application group.

Tolbert *et al.* (1991) suggest that apoptosis acts as a surveillance mechanism, eliminating the buccal cells with genetic damage. Thus, apoptosis in excess of normal

levels may serve as an indicator of genotoxic insult. Condensed chromatin, karyorrhexis, pyknotic and karyolytic cells are cell death biomarkers (Thomas *et al.* 2009). These anomalies are intrinsic to the squamous epithelium, in particular because of the chronic effect of the masticatory process on the oral mucosa and the constant action of mutagenic agents increases the rate of cell deaths, as indicated by the significant elevation of this anomaly (Ramirez and Saldanha 2002). Karyolytic is associated with cytotoxicity, which is also evident in necrotic cells and, karyorrhetic accompany apoptosis (Ramirez and Saldanha 2002), a process under genetic control. The increase in pyknotic and karyorrhetic cells, indicating cell death, was significantly higher in the leaf harvest compared to the pesticide application group. The cytotoxic activities of nicotine on various cell lines were reported by many authors. Nicotine induces apoptosis through the ROS generation in human gingival fibroblasts (Kang *et al.* 2011). And nicotine at high doses and after prolonged time intervals was cytotoxic for mouse bone marrow (Attia 2007). Possibly micronucleated cells have decreased in the leaf harvest group due to increased apoptotic cell death.

The proportion of basal cells and cells undergoing cell death in buccal cells is an indication of the regenerative capacity of this tissue (Thomas *et al.* 2009). In this study, exposed group shown higher values of the condensed chromatin, karyorrhetic, pyknotic and karyolytic cells, indicative of the cell death and an increase of the basal cells compared to the non-exposed group. In the leaf harvest group, potential proliferation was higher compared to the pesticide application group due to the increase of the cell death and basal cell. It has been postulated that repeated exposure to cytotoxicants can result in chronic cell injury, compensatory cell proliferation, hyperplasia, and ultimately tumor development

(Swenberg 1993). In fact, it is assumed that there is a correlation between cell proliferation and cancer induction (Mally and Chipman 2002).

Interindividual differences in the ability to activate or detoxify genotoxic substances could explain differential susceptibility to pesticides exposure (Bolognesi *et al.* 2011). A significant increase in MN frequency in basal cells was observed in the *PON1 Gln/Gln* genotype in the pesticide application group. It was reported that enzymes from the *PON1* genes are responsible for pesticide metabolism, suggesting that the 'unfavorable' alleles could have increased the body load of reactive genotoxic agents in the exposed subjects (Bolognesi 2003; Da Silva *et al.* 2008). Paraoxon hydrolysis is catalyzed by serum paraoxonase (PON1) / arylesterase, an enzyme associated with the lipoprotein fraction of serum. A 10-40 fold difference in serum PON1 activity was observed between individuals, which are genetically determined by polymorphism. It has been suggested that individuals with low enzyme levels may be more susceptible to the toxic effects of organophosphates (Bolognesi 2003). This was observed in our study, where the exposed *Gln/Gln* homozygote individuals presented higher genotoxic effects caused by these pesticides, as detected by their higher MN frequency in basal cells. Da Silva *et al.* (2008), using a group of farmers from Caxias do Sul exposed to organophosphates, showed that mean MN frequency was significantly higher in *Gln/Gln* homozygote farmers than other genotypes. In Alves *et al.* (*in prep*), exposed *Gln/Gln* homozygote individuals presented higher genotoxic effects caused by pesticides in tobacco crop, as detected by their higher MN frequency in buccal cells. DNA damage, assessed by Comet assay, was observed to be significantly higher in individuals exposed to organophosphate pesticides who showed least paraoxonase activity i.e., those with the *Gln/Gln* genotype (Singh *et al.* 2011b).

The polymorphism for the *CYP2A6* gene influenced only karyolitic cells in the leaf harvest group, where *CYP2A6**9/- individuals showed an increase as compared to *CYP2A6**1/*1. Kiyotani *et al.* (2003) suggest that the -48T to G nucleotide substitution in the promoter region of the *CYP2A6* gene decreases the expression of mRNA. The transcriptional significance of the *CYP2A6**9 polymorphism, suggests that *in vivo* levels of *CYP2A6* protein are decreased in subjects carrying this allele (Pitarque *et al.* 2001), the enzymatic activity being about 50% of that of the wildtype. Individuals carrying inactive or reduced-activity *CYP2A6* phenotypes have been reported as being at a lower risk for tobacco-related cancer although conflicting results have also been observed (Vasconcelos *et al.* 2005). *CYP2A6**9/- individuals with reduced enzymatic activity may have a higher likelihood of exhibiting a cytotoxicity effect, probably because of higher plasma concentration caused by the poor capacity of nicotine metabolism.

Measurement of serum BChe activity and the cotinine level was used as an exposure biomarker of pesticide and nicotine, respectively.

Che is an important enzyme for the nervous system and is responsible for acetylcholine degradation. If acetylcholine remains in the neural synapses, it can disrupt the normal functioning of the nervous system. Organophosphates can disrupt Che activity and result in the accumulation of acetylcholine in synapses (Ali *et al.* 2008). Previous studies show a significantly reduced association between exposure to organophosphates and Che in exposed populations (Panemangalore *et al.* 1999; Hernandez *et al.* 2005; Ali *et al.* 2008; Khan *et al.* 2008; Remor *et al.* 2009). In our study, it must be noted that the farmers did not show any clinical signs of intoxication. No significant difference in the activity of serum BChe between non-exposed and worker subjects was found, remaining within the normal range in the groups. Similarly to our results, Shadnia *et al.* (2005) did

not identify an association between chronic exposure to organophosphate and Che inhibition. No correlation in Che activity was observed in relation to *PON1* genotypes. Although the *Gln/Gln* homozygote presents decreased levels compared to *Gln/Arg* or *Gln/Gln* individuals, this difference was not significant. Workers occupationally exposed to organophosphate pesticides did not show a correlation between the *PON1* and Che level (Singh *et al.* 2011b) and neither did the tobacco farmers assessed (Sozmen *et al.* 2007).

Dermal exposure to nicotine is increases during the leaf tobacco harvest (Arcury *et al.* 2003). Cotinine is the main metabolite of nicotine and is used as a biomarkers of the exposure. In this study, we observed that among non-smokers, serum cotinine levels of tobacco farmers in leaf harvest moment were significantly increased, suggesting the absorption of nicotine from tobacco leaves. Studies have estimated that dermal absorption of nicotine results in higher cotinine level in tobacco farmers (Quandt *et al.* 2000; Arcury *et al.* 2003; Onuki *et al.* 2003; Oliveira *et al.* 2010). *CYP2A6*9* is associated with lower nicotine clearance (Benowitz *et al.* 2006). A lower urinary cotinine level is reported in individuals carrying an inactive *CYP2A6* allele (Oscarson 2001). Although the tobacco farmers with *CYP2A6*9/-* genotypes present a lower value than *CYP2A6*1/*1* in the leaf harvest group, no significant correlation between cotinine level and *CYP2A6*9* genotypes is observed.

Results of the present study show nuclear anomalies in the buccal mucosa cells in tobacco farmers exposed a mixture of substances with genotoxic and cytotoxic potential, both during pesticide application and leaf harvest. A slight difference concerning the mutagenicity effect in the BMNcyt assay was found among two different times in the tobacco crop: pesticide application and leaf harvest where, during pesticide application a higher micronucleus values were observed. In addition, some effects of *PON1* and

*CYP2A6**9 genetic polymorphisms on the modulation of DNA damage induced by pesticides and cell death were observed. Genotoxic evaluation using this test is useful and necessary to ensure good occupational conditions and the health of workers. By assessing genotoxic modifications in individuals at risk, those who have a chance of developing diseases such as cancer may be identified and greater care may be recommended.

References

- Ali T, Bhalli JA, Rana SM, Khan QM. 2008. Cytogenetic damage in female Pakistani agricultural workers exposed to pesticides. *Environ Mol Mutagen* 49(5):374-80.
- Alves J, Silva FR, Salvador M, Kvitko K, Rohr P, Henriques JAP, da Silva J. *in preparation*. Occupational exposure and evaluation of genotoxicity in tobacco farmers.
- Arcury TA, Quandt SA, Preisser JS, Bernert JT, Norton D, Wang J. 2003. High levels of transdermal nicotine exposure produce green tobacco sickness in Latino farmworkers. *Nicotine Tob Res* 5(3):315-21.
- Arcury TA, Vallejos QM, Schulz MR, Feldman SR, Fleischer AB, Jr., Verma A, Quandt SA. 2008. Green tobacco sickness and skin integrity among migrant Latino farmworkers. *Am J Ind Med* 51(3):195-203.
- Attia SM. 2007. The genotoxic and cytotoxic effects of nicotine in the mouse bone marrow. *Mutat Res* 632(1-2):29-36.
- Au WW, Cajas-Salazar N, Salama S. 1998. Factors contributing to discrepancies in population monitoring studies. *Mutat Res* 400(1-2):467-78.
- Au WW, Sierra-Torres CH, Cajas-Salazar N, Shipp BK, Legator MS. 1999. Cytogenetic effects from exposure to mixed pesticides and the influence from genetic susceptibility. *Environ Health Perspect* 107(6):501-5.
- Ballard T, Ehlers J, Freund E, Auslander M, Brandt V, Halperin W. 1995. Green tobacco sickness: occupational nicotine poisoning in tobacco workers. *Arch Environ Health* 50(5):384-9.
- Benowitz NL, Swan GE, Jacob P, 3rd, Lessov-Schlaggar CN, Tyndale RF. 2006. *CYP2A6* genotype and the metabolism and disposition kinetics of nicotine. *Clin Pharmacol Ther* 80(5):457-67.
- Bishun NP, Lloyd N, Raven RW, Williams DC. 1972. The *in vitro* and *in vivo* cytogenetic effects of nicotine. *Acta Biol Acad Sci Hung* 23(2):175-80.
- Bolognesi C. 2003. Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. *Mutat Res* 543(3):251-72.
- Bolognesi C, Creus A, Ostrosky-Wegman P, Marcos R. 2011. Micronuclei and pesticide exposure. *Mutagenesis* 26(1):19-26.
- Bortoli GM, Azevedo MB, Silva LB. 2009. Cytogenetic biomonitoring of Brazilian workers exposed to pesticides: micronucleus analysis in buccal epithelial cells of soybean growers. *Mutat Res* 675(1-2):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(3):379-406.
- Cattaneo R, Alegretti AP, Sagebin FR, Abreu CMD, Petersen GO, Chatkin JM, Thiesen FV. 2006. Validation of a high-performance liquid chromatography method for the determination of cotinine in urine. *Revista brasileira de toxicologia* 19(1):25-31.
- Costa C, Silva S, Coelho P, Roma-Torres J, Teixeira JP, Mayan O. 2007. Micronucleus analysis in a Portuguese population exposed to pesticides: preliminary survey. *Int J Hyg Environ Health* 210(3-4):415-8.
- Da Silva FR, Erdtmann B, Dalpiaz T, Nunes E, Da Rosa DP, Porawski M, Bona S, Simon CF, Da CAM, Da Silva J. 2010. Effects of dermal exposure to *Nicotiana tabacum* (Jean Nicot, 1560) leaves in mouse evaluated by multiple methods and tissues. *J Agric Food Chem* 58(17):9868-74.
- Da Silva J, Moraes CR, Heuser VD, Andrade VM, Silva FR, Kvitko K, Emmel V, Rohr P, Bordin DL, Andreazza AC and others. 2008. Evaluation of genetic damage in a Brazilian population occupationally exposed to pesticides and its correlation with polymorphisms in metabolizing genes. *Mutagenesis* 23(5):415-22.
- Dhillon VS, Thomas P, Fenech M. 2004. Comparison of DNA damage and repair following radiation challenge in buccal cells and lymphocytes using single-cell gel electrophoresis. *Int J Radiat Biol* 80(7):517-28.
- Diler SB, Celik A. 2011. Cytogenetic Biomonitoring of Carpet Fabric Workers Using Micronucleus Frequency, Nuclear Changes, and the Calculation of Risk Assessment by Repair Index in Exfoliated Mucosa Cells. *DNA Cell Biol*.
- Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Jr., Feather-Stone RM. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 7:88-95.
- Ergene S, Celik A, Cavas T, Kaya F. 2007. Genotoxic biomonitoring study of population residing in pesticide contaminated regions in Goksu Delta: micronucleus, chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges. *Environ Int* 33(7):877-85.
- He JL, Jin HY, Jin LF, Gao SY. 2000. Monitoring of human exposure to radiation with the binucleated lymphocyte micronucleus assay. *Biomed Environ Sci* 13(1):32-6.
- Hernandez AF, Lopez O, Rodrigo L, Gil F, Pena G, Serrano JL, Parron T, Alvarez JC, Lorente JA, Pla A. 2005. Changes in erythrocyte enzymes in humans long-term exposed to pesticides: influence of several markers of individual susceptibility. *Toxicol Lett* 159(1):13-21.
- Heuser VD, Erdtmann B, Kvitko K, Rohr P, da Silva J. 2007. Evaluation of genetic damage in Brazilian footwear-workers: biomarkers of exposure, effect, and susceptibility. *Toxicology* 232(3):235-47.
- Hoffmann H, Hogel J, Speit G. 2005. The effect of smoking on DNA effects in the comet assay: a meta-analysis. *Mutagenesis* 20(6):455-66.
- Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, Knasmueller S, Fenech M. 2008. 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* 659(1-2):93-108.

- 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(1):73-6.
- Iarmarcovai G, Bonassi S, Botta A, Baan RA, Orsiere T. 2008. Genetic polymorphisms and micronucleus formation: a review of the literature. *Mutat Res* 658(3):215-33.
- Kang SW, Park HJ, Ban JY, Chung JH, Chun GS, Cho JO. 2011. Effects of nicotine on apoptosis in human gingival fibroblasts. *Arch Oral Biol*.
- Khan DA, Bhatti MM, Khan FA, Naqvi ST, Karam A. 2008. Adverse effects of pesticides residues on biochemical markers in pakistani tobacco farmers. *Int J Clin Exp Med* 1(3):274-82.
- Khan DA, Hashmi I, Mahjabeen W, Naqvi TA. 2010. Monitoring health implications of pesticide exposure in factory workers in Pakistan. *Environ Monit Assess* 168(1-4):231-40.
- Kiyotani K, Yamazaki H, Fujieda M, Iwano S, Matsumura K, Satarug S, Ujjin P, Shimada T, Guengerich FP, Parkinson A and others. 2003. Decreased coumarin 7-hydroxylase activities and CYP2A6 expression levels in humans caused by genetic polymorphism in CYP2A6 promoter region (*CYP2A6*9*). *Pharmacogenetics* 13(11):689-95.
- Mally A, Chipman JK. 2002. Non-genotoxic carcinogens: early effects on gap junctions, cell proliferation and apoptosis in the rat. *Toxicology* 180(3):233-48.
- Messina ES, Tyndale RF, Sellers EM. 1997. A major role for CYP2A6 in nicotine C-oxidation by human liver microsomes. *J Pharmacol Exp Ther* 282(3):1608-14.
- Nakajima M, Yamamoto T, Nunoya K, Yokoi T, Nagashima K, Inoue K, Funae Y, Shimada N, Kamataki T, Kuroiwa Y. 1996. Role of human cytochrome P4502A6 in C-oxidation of nicotine. *Drug Metab Dispos* 24(11):1212-7.
- NIOSH AHSCN. 1996. Southeast Center Studies Ways to Prevent Green Tobacco Sickness.
- Ntow WJ, Tagoe LM, Drechsel P, Kelderman P, Nyarko E, Gijzen HJ. 2009. Occupational exposure to pesticides: blood cholinesterase activity in a farming community in Ghana. *Arch Environ Contam Toxicol* 56(3):623-30.
- Oliveira PPV, B. SC, Moura L, Malta DC, Torres MCA, Lima SMCP, Lima ALA, Leite CE, Costa-e-Silva VL, Sobel J and others. 2010. First reported outbreak of green tobacco sickness in Brazil. *Caderno de Saúde Pública* 26(12):2263-2269.
- Onuki M, Yokoyama K, Kimura K, Sato H, Nordin RB, Naing L, Morita Y, Sakai T, Kobayashi Y, Araki S. 2003. Assessment of urinary cotinine as a marker of nicotine absorption from tobacco leaves: a study on tobacco farmers in Malaysia. *J Occup Health* 45(3):140-5.
- Oscarson M. 2001. Genetic polymorphisms in the cytochrome P450 2A6 (*CYP2A6*) gene: implications for interindividual differences in nicotine metabolism. *Drug Metab Dispos* 29(2):91-5.
- Panemangalore M, Dowla HA, Byers ME. 1999. Occupational exposure to agricultural chemicals: effect on the activities of some enzymes in the blood of farm workers. *Int Arch Occup Environ Health* 72(2):84-8.
- Parikh JR, Gokani VN, Doctor PB, Kulkarni PK, Shah AR, Saiyed HN. 2005. Acute and chronic health effects due to green tobacco exposure in agricultural workers. *Am J Ind Med* 47(6):494-9.

- Pastor S, Creus A, Parron T, Cebulska-Wasilewska A, Siffel C, Piperakis S, Marcos R. 2003. Biomonitoring of four European populations occupationally exposed to pesticides: use of micronuclei as biomarkers. *Mutagenesis* 18(3):249-58.
- Pastor S, Lucero L, Gutierrez S, Durban R, Gomez C, Parron T, Creus A, Marcos R. 2002. A follow-up study on micronucleus frequency in Spanish agricultural workers exposed to pesticides. *Mutagenesis* 17(1):79-82.
- Pitarque M, von Richter O, Oke B, Berkkkan H, Oscarson M, Ingelman-Sundberg M. 2001. Identification of a single nucleotide polymorphism in the TATA box of the CYP2A6 gene: impairment of its promoter activity. *Biochem Biophys Res Commun* 284(2):455-60.
- Quandt SA, Arcury TA, Preisser JS, Norton D, Austin C. 2000. Migrant farmworkers and green tobacco sickness: new issues for an understudied disease. *Am J Ind Med* 37(3):307-15.
- Racowsky C, Hendricks RC, Baldwin KV. 1989. Direct effects of nicotine on the meiotic maturation of hamster oocytes. *Reprod Toxicol* 3(1):13-21.
- Ramirez A, Saldanha PH. 2002. Micronucleus investigation of alcoholic patients with oral carcinomas. *Genet Mol Res* 1(3):246-60.
- Ramirez V, Cuenca P. 2001. Micronuclei frequency in lymphocytes of individuals occupationally exposed to pesticides. *Rev Biol Trop* 49(1):1-8.
- Remor AP, Totti CC, Moreira DA, Dutra GP, Heuser VD, Boeira JM. 2009. Occupational exposure of farm workers to pesticides: biochemical parameters and evaluation of genotoxicity. *Environ Int* 35(2):273-8.
- Rohlman DS, Anger WK, Lein PJ. 2011. Correlating neurobehavioral performance with biomarkers of organophosphorous pesticide exposure. *Neurotoxicology* 32(2):268-76.
- Rohr P, da Silva J, Erdtmann B, Saffi J, Guecheva TN, Antonio Pegas 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(1):20-7.
- Sanchez-Siles M, Ros-Llor I, Camacho-Alonso F, Lopez-Jornet P. 2011. A novel application of the buccal micronucleus cytome assay in oral lichen planus: A pilot study. *Arch Oral Biol*.
- Schoedel KA, Hoffmann EB, Rao Y, Sellers EM, Tyndale RF. 2004. Ethnic variation in CYP2A6 and association of genetically slow nicotine metabolism and smoking in adult Caucasians. *Pharmacogenetics* 14(9):615-26.
- Shadnia S, Azizi E, Hosseini R, Khoei S, Fouladdel S, Pajoumand A, Jalali N, Abdollahi M. 2005. Evaluation of oxidative stress and genotoxicity in organophosphorus insecticide formulators. *Hum Exp Toxicol* 24(9):439-45.
- Shimizu N, Shingaki K, Kaneko-Sasaguri Y, Hashizume T, Kanda T. 2005. When, where and how the bridge breaks: anaphase bridge breakage plays a crucial role in gene amplification and HSR generation. *Exp Cell Res* 302(2):233-43.
- Singh NP, Danner DB, Tice RR, Brant L, Schneider EL. 1990. DNA damage and repair with age in individual human lymphocytes. *Mutat Res* 237(3-4):123-30.
- Singh S, Kumar V, Thakur S, Banerjee BD, Chandna S, Rautela RS, Grover SS, Rawat DS, Pasha ST, Jain SK and others. 2011a. DNA damage and cholinesterase activity in occupational workers exposed to pesticides. *Environ Toxicol Pharmacol* 31(2):278-85.

- Singh S, Kumar V, Thakur S, Banerjee BD, Rautela RS, Grover SS, Rawat DS, Pasha ST, Jain SK, Ichhpujani RL and others. 2011b. Paraoxonase-1 genetic polymorphisms and susceptibility to DNA damage in workers occupationally exposed to organophosphate pesticides. *Toxicol Appl Pharmacol* 252(2):130-7.
- Sozmen B, Peker S, Kaya U, Erkan M, Sozmen EY. 2007. Markers of long-term exposure to organophosphorus pesticides in farmers who work in viniculture and tobacco production in Turkey. *Toxicol Mech Methods* 17(7):379-84.
- Swenberg JA. 1993. Cell Proliferation and Chemical Carcinogenesis: summary and future directions. *Environ Health Perspect* 101(Suppl 5):153-8.
- Thomas P, Harvey S, Gruner T, Fenech M. 2008. The buccal cytome and micronucleus frequency is substantially altered in Down's syndrome and normal ageing compared to young healthy controls. *Mutat Res* 638(1-2):37-47.
- Thomas P, Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, Knasmueller S, Fenech M. 2009. Buccal micronucleus cytome assay. *Nat Protoc* 4(6):825-37.
- Tolbert PE, Shy CM, Allen JW. 1991. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: a field test in snuff users. *Am J Epidemiol* 134(8):840-50.
- Vasconcelos GM, Struchiner CJ, Suarez-Kurtz G. 2005. CYP2A6 genetic polymorphisms and correlation with smoking status in Brazilians. *Pharmacogenomics J* 5(1):42-8.

Table I: Evaluation of genetic damage in tobacco farmers: main demographic characteristics of the studied subjects

	Non-exposed group	Exposed group
N° of subjects	53	106
Age (years) [mean±S.D]	41.93 ± 13.55	42.33 ± 13.88
Exposure time (years) [mean±S.D]	-	30.34 ± 15.35
Gender	19 males, 34 females	62 males, 44 females
Smokers^a (%)	3 (5.55)	7 (6.61)
Non-smokers (%)	50 (94.45)	99 (93.39)

S.D.= standard deviation; ^asmoking 20 or more cigarettes per day (Hoffmann *et al.*, 2005).

Table II: Buccal micronucleus cytome assay results for cells collected from non-exposed and exposed groups [mean±S.D]

Groups (n)	Non-exposed (53)	Pesticide application (102)	Leaf harvest (85)
<i>Basal Cell Layer</i>			
Basal	9.93 ± 9.17	11.70 ± 3.96 ^a	19.73 ± 7.20 ^{b,e}
Basal micronucleated	0.00 ± 0.00	1.77 ± 1.80 ^{b,d}	0.49 ± 0.69 ^b
<i>Differentiated Cell Layer</i>			
Micronuclei	0.72 ± 0.92	9.74 ± 4.60 ^{b,d}	3.83 ± 1.91 ^b
Nuclear buds	0.57 ± 0.88	7.64 ± 5.47 ^b	7.21 ± 3.56 ^b
Binucleated	7.43 ± 5.32	10.01 ± 5.50 ^a	13.94 ± 6.01 ^{b,e}
Condensed chromatin	12.11 ± 9.28	13.16 ± 5.19 ^d	8.42 ± 3.95
Karyorrhectic	13.78 ± 8.41	10.71 ± 5.89 ^c	16.64 ± 7.79 ^{c,e}
Pyknotic	3.28 ± 3.27	2.38 ± 2.04	13.49 ± 7.79 ^{b,e}
Karyolytic	7.43 ± 4.77	27.98 ± 9.49 ^{b,d}	20.70 ± 8.51 ^b

Significant in relation to non-exposed group ^aP<0.05, ^bP<0.01 and ^cP<0.001 (Mann Whitney Test). Significant in relation to leaf harvest ^dP<0.001 and to pesticide application group ^eP<0.001 (Wilcoxon Test). n= number of individuals.

Table III: *PON1* Gln192Arg and *CYP2A6**9 (-48T>G) genotype distribution and variant alleles frequencies in non-exposed and exposed groups

Genotypes	Non-exposed	Exposed	<i>p</i>^a
<i>PON1</i> Gln192Arg			
<i>Gln/Gln</i>	32 (59.26)	47 (41.59)	<i>0.11</i>
<i>Gln/Arg</i>	16 (29.63)	48 (42.48)	
<i>Arg/Arg</i>	6 (11.11)	18 (15.93)	
<i>PON1</i> 192Arg	25.9	37.2	
<i>CYP2A6</i>*9 (-48T>G)			
<i>*1/*1</i>	40 (88.89)	78 (86.67)	<i>0.93</i>
<i>*1/*9</i>	5 (11.11)	11 (12.22)	
<i>*9/*9</i>	0 (0.0)	1 (1.11)	
<i>CYP2A6</i>*9	5.6	7.2	

^a*P*-value calculated using Fisher's exact test comparing genotype and allelic frequencies between non-exposed and exposed groups.

Table IV: Effect of the *PON1 Gln192Arg* and *CYP2A6*9 (-48T>G)* genotypes on the buccal micronucleus cytome assay results in non-exposed and exposed groups [mean±S.D]

		Genotype	Non-exposed	Pesticide application	Leaf harvest
Basal Cell Layer	Basal	<i>PON Gln/Gln</i>	9.17 ± 8.64 (n=30)	11.81 ± 3.35 (n=36)	19.29 ± 6.75 (n=35)
		<i>PON Gln/Arg or Arg/Arg</i>	11.35 ± 9.85 (n=23)	11.63 ± 4.33 (n=56)	20.04 ± 7.55 (n=49)
		<i>CYP2A6 *1/*1</i>	10.19 ± 9.54 (n=40)	11.64 ± 4.25 (n=74)	19.55 ± 7.39 (n=65)
		<i>CYP2A6 *9/*1 or *9/*9</i>	7.60 ± 8.65 (n=5)	12.73 ± 1.49 (n=11)	21.18 ± 6.21 (n=11)
	Micronuclei	<i>PON Gln/Gln</i>	0.00 ± 0.00 (n=30)	2.17 ± 1.83 ^a (n=36)	0.54 ± 0.70 (n=35)
		<i>PON Gln/Arg or Arg/Arg</i>	0.00 ± 0.00 (n=23)	1.52 ± 1.75 (n=56)	0.45 ± 0.68 (n=49)
		<i>CYP2A6 *1/*1</i>	0.00 ± 0.00 (n=40)	1.89 ± 1.88 (n=74)	0.52 ± 0.71 (n=65)
		<i>CYP2A6 *9/*1 or *9/*9</i>	0.00 ± 0.00 (n=5)	1.18 ± 1.17 (n=11)	0.45 ± 0.69 (n=11)
Differentiated Cell Layer	Micronuclei	<i>PON Gln/Gln</i>	0.83 ± 1.08 (n=30)	9.00 ± 4.03 (n=36)	4.06 ± 1.63 (n=35)
		<i>PON Gln/Arg or Arg/Arg</i>	0.52 ± 0.59 (n=23)	10.21 ± 4.90 (n=56)	3.67 ± 2.09 (n=49)
		<i>CYP2A6 *1/*1</i>	0.76 ± 0.98 (n=40)	9.72 ± 4.67 (n=74)	3.83 ± 1.99 (n=65)
		<i>CYP2A6 *9/*1 or *9/*9</i>	0.60 ± 0.55 (n=5)	9.45 ± 4.76 (n=11)	3.91 ± 1.64 (n=11)
	Nuclear buds	<i>PON Gln/Gln</i>	0.57 ± 0.94 (n=30)	6.53 ± 5.33 (n=36)	6.97 ± 2.96 (n=35)
		<i>PON Gln/Arg or Arg/Arg</i>	0.61 ± 0.84 (n=23)	8.36 ± 5.48 (n=56)	7.39 ± 3.96 (n=49)
		<i>CYP2A6 *1/*1</i>	0.62 ± 0.94 (n=40)	7.88 ± 5.24 (n=74)	7.00 ± 3.44 (n=65)
		<i>CYP2A6 *9/*1 or *9/*9</i>	0.40 ± 0.89 (n=5)	8.09 ± 7.67 (n=11)	7.00 ± 4.19 (n=11)
	Binucleated	<i>PON Gln/Gln</i>	7.17 ± 4.60 (n=30)	8.89 ± 5.02 (n=36)	14.57 ± 6.22 (n=35)
		<i>PON Gln/Arg or Arg/Arg</i>	7.96 ± 6.24 (n=23)	10.73 ± 5.72 (n=56)	13.49 ± 5.87 (n=49)
		<i>CYP2A6 *1/*1</i>	7.86 ± 5.44 (n=40)	10.14 ± 5.54 (n=74)	13.42 ± 5.76 (n=65)
		<i>CYP2A6 *9/*1 or *9/*9</i>	5.20 ± 3.56 (n=5)	9.64 ± 4.98 (n=11)	16.09 ± 6.56 (n=11)
	Condensed chromatin	<i>PON Gln/Gln</i>	13.47 ± 10.31 (n=30)	14.00 ± 4.88 (n=36)	8.06 ± 3.65 (n=35)
		<i>PON Gln/Arg or Arg/Arg</i>	10.78 ± 7.64 (n=23)	12.63 ± 5.36 (n=56)	8.67 ± 4.18 (n=49)
		<i>CYP2A6 *1/*1</i>	12.45 ± 9.58 (n=40)	13.08 ± 5.24 (n=74)	8.03 ± 3.44 (n=65)
		<i>CYP2A6 *9/*1 or *9/*9</i>	8.00 ± 4.85 (n=5)	13.36 ± 5.41 (n=11)	9.09 ± 3.70 (n=11)
	Karyorrhectic	<i>PON Gln/Gln</i>	14.10 ± 8.99 (n=30)	10.44 ± 5.22 (n=36)	16.94 ± 9.05 (n=35)
		<i>PON Gln/Arg or Arg/Arg</i>	13.39 ± 7.98 (n=23)	10.88 ± 6.32 (n=56)	16.43 ± 6.85 (n=49)
		<i>CYP2A6 *1/*1</i>	13.88 ± 9.00 (n=40)	11.08 ± 5.93 (n=74)	16.23 ± 7.68 (n=65)
		<i>CYP2A6 *9/*1 or *9/*9</i>	9.60 ± 2.70 (n=5)	10.09 ± 6.41 (n=11)	19.64 ± 8.18 (n=11)
Pyknotic	<i>PON Gln/Gln</i>	2.53 ± 2.58 (n=30)	2.33 ± 1.41 (n=36)	14.06 ± 8.23 (n=35)	
	<i>PON Gln/Arg or Arg/Arg</i>	4.30 ± 3.88 (n=23)	2.41 ± 2.40 (n=56)	13.08 ± 7.52 (n=49)	
	<i>CYP2A6 *1/*1</i>	3.50 ± 3.47 (n=40)	2.45 ± 2.13 (n=74)	12.72 ± 7.55 (n=65)	
	<i>CYP2A6 *9/*1 or *9/*9</i>	1.60 ± 2.51 (n=5)	2.55 ± 1.86 (n=11)	18.09 ± 9.67 (n=11)	
Karyolytic	<i>PON Gln/Gln</i>	6.97 ± 3.64 (n=30)	25.78 ± 6.88 (n=36)	19.91 ± 8.55 (n=35)	
	<i>PON Gln/Arg or Arg/Arg</i>	8.13 ± 6.01 (n=23)	29.39 ± 10.67 (n=56)	21.27 ± 8.53 (n=49)	
	<i>CYP2A6 *1/*1</i>	7.50 ± 4.71 (n=40)	27.76 ± 8.59 (n=74)	19.72 ± 8.03 (n=65)	
	<i>CYP2A6 *9/*1 or *9/*9</i>	5.40 ± 4.34 (n=5)	30.64 ± 15.86 (n=11)	26.27 ± 8.87 ^a (n=11)	

Significantly different in relation to the variant (heterozygous and homozygous) genotypes from the same group ^aP<0.05 (Mann-Whitney Test). n, Number of individuals evaluated.

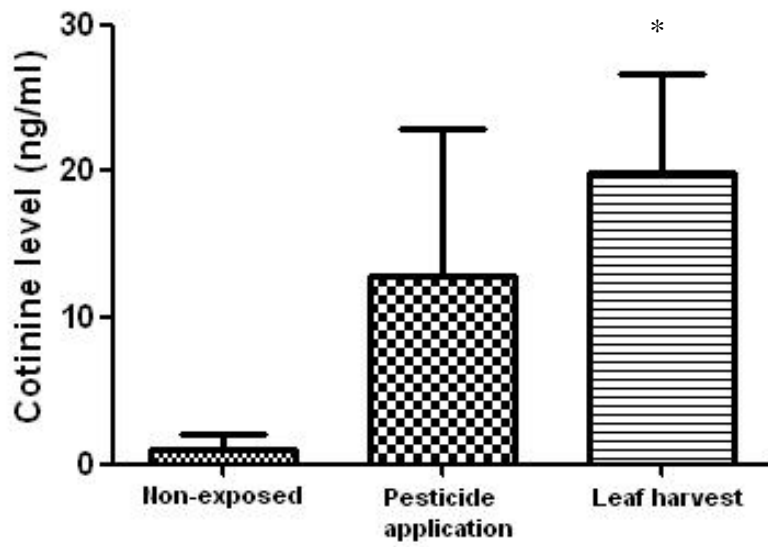


Figure 1: Concentrations of cotinine (ng/ml) in the serum blood samples of tobacco farmers and non-exposed individuals (*Significant in relation to non-exposed group- $P < 0.05$, Mann Whitney test/Wilcoxon test).

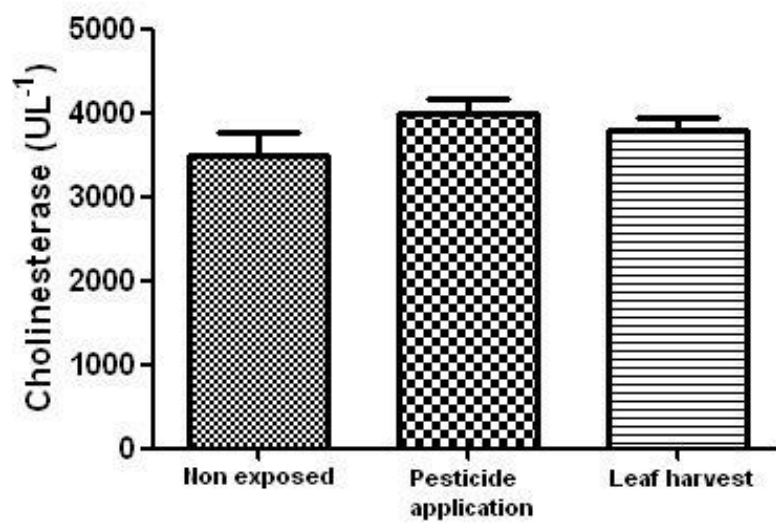


Figure 2: Concentrations of cholinesterase (UL⁻¹) in the serum blood samples of tobacco farmers and non-exposed individuals (Paired and unpaired t-test).

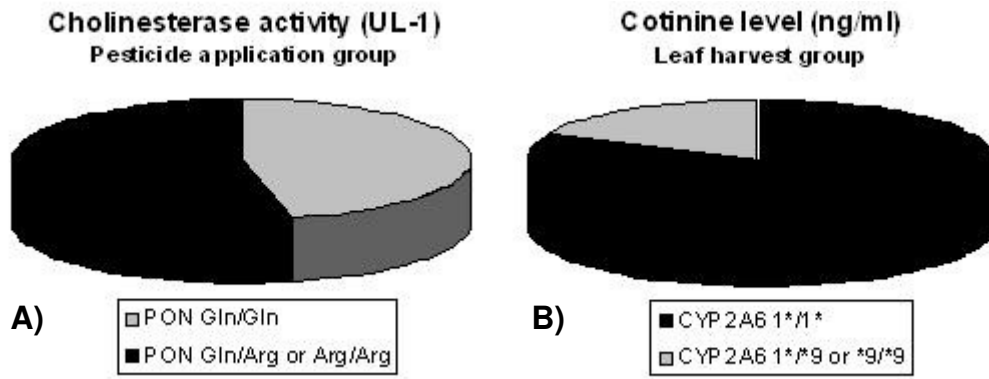


Figure 3: Effect of the *PON1 Gln192Arg* and *CYP2A6*9 (-48T>G)* genotypes on the level of A) cholinesterase and B) cotinine biomarkers in the exposed group (pesticide application and leaf harvest groups, respectively). Unpaired t-test.

CAPÍTULO IV

Genotoxic biomonitoring of tobacco farmers: biomarkers of exposure, of early biological effects and of susceptibility.

Fernanda Rabaioli Da Silva^a, Juliana Da Silva^b, Mariangela da C. Allgayer^c, Caroline F. Simon^c, Johny F. Dias^d, Carla E. I. dos Santos^d, Mirian Salvador^e, Catia Branco^e, Nayê Balzan Schneider^a, Vivian Kahl^b, Paula Rohr^a, Kátia Kvitko^{a,*}

^a Postgraduate Programme in Genetics and Molecular Biology (PPGBM), Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre-RS, Brazil

^b Laboratory of Genetic Toxicology, Postgraduate Programme in Genetic and Applied Toxicology (PPGGTA), Lutheran University of Brazil (ULBRA), Canoas-RS, Brazil

^c Veterinary Clinical Pathology Laboratory, Lutheran University of Brazil, 92425-900, Canoas, RS, Brazil

^d School of Physics, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

^e Biotechnology Institute, University of Caxias do Sul, Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil;

*Correspondence to: Kátia Kvitko, Departamento de Genética e Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Caxias do Sul - RS, Brazil. E-mail: katia.kvitko@ufrgs.br; Juliana da Silva, Universidade Luterana do Brasil, ULBRA, Av. Farroupilha 8001, Prédio 1, Sala 122; 92425-900; Canoas, RS, Brazil. E-mail: juliana.silva@ulbra.br

Artigo a ser submetido à Environmental Pollution

Abstract

Tobacco is an important cash crop in Brazil. Tobacco farming presents several hazards to those who cultivate and harvest the plant, because of the contact with pesticides and with green tobacco leaves, with the absorption of nicotine through the skin. The genotoxic and mutagenic effects as well as chromosomal instability in tobacco farmers were investigated. In order to verify the relationship between genetic susceptibility and biomarkers *GSTT1*, *GSTM1*, *GSTP1*, *CYP2A6*, *PON*, *OGG1*, *RAD51*, *XRCC1* and *XRCC4* genes polymorphism were evaluated. Oxidative stress markers and trace elements content were determined. Peripheral blood cells samples were collected from 111 agricultural workers at two different crop times (during pesticides application and leaf harvest), and 56 non-exposed subjects. Results show that tobacco farmers are exposed to mixture of substances with genotoxic and cytotoxic potential. Difference in the results was found among two different times in the exposed group. From the nine markers of individual susceptibility studied in this paper, only *GSTM1* null and *CYP2A6**9, showed significant associations with Cytokinesis-blocked micronuclei assay results in farmers' cells. In pesticide application an increase in trace elements content (chromium, magnesium, aluminum, chloride, zinc and potassium) was observed, compared to non-exposed and leaf harvest group. The results also indicated that chronic exposure to pesticides, synthetic and natural, can influence antioxidant enzymes activity. Thus, developing countries should use such data to establish safety occupational intervention during the use of pesticides and also during tobacco leaf harvest.

Key words: Comet assay, Micronucleus test, tobacco farmers, pesticides, nicotine, genetic polymorphism

1. Introduction

Genotoxic potential is a primary risk factor for long-term effects, such as carcinogenic and reproductive toxicology and degenerative diseases (Bolognesi *et al.*, 2011). Biomonitoring studies focusing on genomic modifications have been carried out in populations exposed to pesticides in different countries to elucidate the risk associated to the exposure to specific compounds or classes of compounds or to specific cultivation practices (Bolognesi, 2003; Bull *et al.*, 2006).

Tobacco is an agricultural product of economic importance in Brazil, characterized by intensive use of pesticides. Pesticides are commonly used to increase crop yield, but their health impact has not been studied yet. Dithiocarbamate fungicide, dinitroaniline herbicide, pyrethroid insecticide, organophosphorus insecticides, copper pesticide are some agrochemicals used in tobacco plantations (Kimura *et al.*, 2005; Kiaune and Singhasemanon, 2011; Alves *et al.*, *in prep*). Tobacco farming presents several hazards to those who cultivate and harvest the plant. Although some of these hazards, such as pesticide exposure and musculoskeletal trauma (Pugh *et al.*, 2000), are faced by workers in other types of agricultural production, tobacco production presents some unique hazards, most notably acute nicotine poisoning, a condition also known as green tobacco sickness (GTS) (Quandt *et al.*, 2000; Arcury *et al.*, 2003; Onuki *et al.*, 2003).

GTS is an occupational poisoning that can affect workers who cultivate and harvest tobacco. It occurs when workers absorb nicotine through the skin as they come into contact with leaves of the mature tobacco plant. GTS is characterized largely by nausea, vomiting, headache, muscle weakness, and dizziness (Arcury *et al.*, 2003; Onuki *et al.*, 2003). Studies on pesticide users revealed that organophosphorus and dithiocarbamate affected peripheral nerve conduction and postural balance. Subjective symptoms related to GTS

were also observed, indicating the effects of nicotine absorbed from wet tobacco leaves (Yokoyama, 2007).

The general pattern in pesticide exposure is the simultaneous use of complex mixtures of chemical compounds, which makes it difficult to determine the possible synergic/antagonist effects among them (Bolognesi *et al.*, 2011). In this context, the cytokinesis-block micronucleus micronucleus assay, developed in 1985 (Fenech and Morley, 1985) as an easy alternative to the chromosome aberration test, opened the possibility to deepen the knowledge about the genotoxic risk associated to pesticide exposure (Bolognesi *et al.*, 2011) (including nicotine as natural pesticide) as well as the Comet assay. In addition, the complex interaction of host defense mechanisms involved after genotoxic exposure still needs to be understood: interindividual differences in the ability to activate or detoxify genotoxic substances and to repair DNA damage could explain differential susceptibility to pesticides exposure (Bolognesi *et al.*, 2011).

Therefore, biomarkers of early biological effects and biomarkers of exposure were evaluated in this study: the genotoxicity and the mutagenicity in tobacco farmers were investigated by Comet assay and Micronucleus test, respectively; the superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activities and the level of TBARS were analyzed in farmers, to detect possible effects of these chemicals; the total blood chemical elements levels were also assessed. In order to evaluate if genetically determined individual variations in xenobiotic metabolizing and repair DNA damage capacity could modify individual susceptibility to the possible genotoxic effects of pesticides and nicotine, the subjects were genotyped for several genes.

2. Material and Methods

2.1. Subjects

The sample was composed of 167 individuals, 56 non-exposed and 111 exposed. Subjects from Venâncio Aires and Santa Cruz do Sul (in northeastern state of Rio Grande do Sul, southern Brazil) were sampled from July (2008) to February (2010). Blood cells samples were collected during two different times in the tobacco season (at a five-month interval): pesticide application (102 individuals) and leaf harvest (85 individuals). Samples were also collected from a non-exposed group. The non-exposed individuals were office employees living in the same region as the exposed individuals.

All procedures adopted in this study were approved by the Committee on Research Ethics of UFRGS, and written informed consent was obtained from each individual before the start of the research. All individuals in the study were asked to answer a Portuguese-language version of a questionnaire from the International Commission for Protection against Environmental Mutagens and Carcinogens (Carrano and Natarajan, 1988) and to participate in a face-to-face interview, which included standard demographic data (age, gender, etc.), as well as questions related to medical issues (exposure to X-rays, vaccinations, medication, etc.), life style (smoking, coffee and alcohol consumption, diet, etc.) and occupation (number of working hours per day, time exposed to pesticide, pesticide application duration, pesticide type, protective measures adopted (PPE), etc. In all groups, individuals who smoked more than twenty cigarettes per day for at least 1 year were considered smokers (Hoffmann *et al.*, 2005).

2.2. Comet assay

The alkaline Comet assay was performed as described by Singh *et al.* (1988) with the modifications suggested by Tice *et al.* (2000). Blood cells (5 μ l) were embedded in 95 μ l of 0.75% low-melting point agarose, which was immediately added to the surface of a pre-coated (1.5% agarose) microscope slide. When agarose had solidified, the slides were placed in lysis buffer (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA and 10 mM Tris; pH 10.0–10.5) containing freshly added 1% (v/v) Triton X-100 and 10% (v/v) dimethyl sulfoxide (DMSO) for a minimum of 1 h and a maximum of 2 weeks. After treatment with lysis buffer, the slides were incubated in freshly made alkaline buffer (300 mM NaOH and 1 mM EDTA; pH > 13) for 20 min and the DNA was electrophoresed for 20 min at 25 V (0.90 V/cm) and 300 mA after which the buffer was neutralized with 0.4 M Tris (pH 7.5) and dried overnight. Gels were re-hydrated for 5 min in distilled water, and then stained for 15 min (37°C) with a solution containing the following sequence: 34 mL of Solution B (0.2% w/v ammonium nitrate, 0.2% w/v silver nitrate, 0.5% w/v tungstosilicic acid, 0.15% v/v formaldehyde, 5% w/v sodium carbonate) and 66 mL of Solution A (5% sodium carbonate). The staining was stopped with 1% acetic acid and the gels were air dried (Nadin *et al.*, 2001).

Images of 100 randomly selected cells (50 cells from each of two replicate slides) were analyzed by the same person using bright-field optical microscopy. Two parameters were evaluated: (1) damage index (DI), for which each cell was allocated to one of five classes (from no damage = 0 to maximum damage = 4) according to tail size and shape (see figures in Heuser *et al.* (2007)). The values obtained for each volunteer could range from 0 (0 \times 100) to 400 (4 \times 100); and (2) damage frequency (DF), calculated as the percentage of damaged cells. International guidelines and recommendations for the Comet

assay consider that visual scoring of comets is a well-validated evaluation method. Although the DI parameter is subjective, it is highly correlated with computer-based image analysis (Tice *et al.*, 2000; Collins, 2004). All the slides were scored blind.

2.3. MN test: cytokinesis-blocked human lymphocyte MN

For each blood sample, duplicate lymphocyte cultures were set up in culture flasks by adding 0.3 ml whole blood to 5 ml PB-MAX™ karyotyping medium (Invitrogen, GIBCO). The flasks were incubated at 37 °C for 44 h before adding 5µg/ml of cytochalasin B (Sigma) and continuing incubation until the total time reached was 72 h, as described by Fenech (1993). After incubation, lymphocytes were harvested by centrifugation at 1200 r.p.m. for 8 min, re-centrifuged, fixed in 3:1 (v/v) methanol/acetic acid, placed on a clean microscope slide and stained with 5% (v/v) Giemsa. For each blood sample, 2000 binucleated cells (BN) (i.e. 1000 from each of the two slides prepared from the duplicate cultures) were scored for micronuclei (MN), nucleoplasmic bridge (NPB) and nuclear bud (NBUD) presence, which was assessed using bright-field optical microscopy at a magnification of x200–1000. All sides were coded for blind analysis.

2.4. Oxidative stress parameters

2.4.1. Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)

TBARS concentration (Wills, 1966) was measured spectrophotometrically and results were expressed as nmolmL⁻¹.

2.4.2. Superoxide dismutase activity (SOD)

Superoxide dismutase activity was determined spectrophotometrically in serum samples by measuring the inhibition of the rate of auto-catalytic adrenochrome formation at 480 nm in a reaction medium containing a final concentration of 1 mmolL⁻¹ adrenaline (pH 2.0) and 50 mmolL⁻¹ glycine (pH 10.2) (Bannister and Calabrese, 1987), both from E. Merck, with a resulting pH of 10.0. This reaction was conducted at a constant temperature of 30°C for 3 min. The enzymatic activity was expressed as superoxide dismutase units per gram of protein. One unit is defined as the amount of enzyme that inhibits the rate of adrenochrome formation in 50%.

2.4.3. Catalase activity (CAT)

The assay principle is based on the determination of the rate of hydrogen peroxide (E. Merck) decomposition at 240 nm (Aebi, 1984). The reaction was conducted at constant temperature (30°C) for 1 min. The enzymatic activity is expressed as catalase units per mg of protein. One unit of catalase decomposed 1 µmol of H₂O₂ per min at pH 7.4 and 30°C.

2.4.4. Total protein

The total protein levels were analyzed by Biureto methods (Kit Proteínas Totais – Labtest Diagnostica S. A., Brazil), for spectrophotometrical determination in 545 nm.

2.5. Hematocrit Analysis

The determination of erythroid cell volume, expressed in percentage, was carried out according to the microhematocrit method (ICSH, 1980).

2.6. Trace elements analysis by PIXE

The trace elements content in total blood of the tobacco farmers and non-exposed group was analyzed. Briefly, dried blood samples were well homogenized and pressed into thick pellets, which were placed in the target holder inside the reaction chamber. During the experiments, the pressure inside the reaction chamber was about 10⁻⁵ mbar. The experiments were carried out at the Ion Implantation Laboratory of the School of Physics, Federal University of Rio Grande do Sul (IF-UFRGS). A 3-MV Tandatron accelerator provided a 2.0-MeV proton beam with an average current of 5 nA at the target. The X-rays produced in the samples were detected by a germanium (Ge) detector with an energy resolution of about 180 eV in 5.9 keV with high efficiency between 3 and 100 keV. The spectra were analyzed with the GUPIX software package and the data are expressed in part per million (ppm) (Campbell *et al.*, 2000).

2.7. Genotyping

2.7.1. *GST* genes: *GSTM1*, *GSTT1* and *GSTP1*

GSTM1, *GSTT1* and *GSTP1* genes were genotyped by a multiplex PCR method, according to a previously published description (Da Silva *et al.*, 2008). An aliquot of the amplification product was submitted to horizontal agarose gel (3%) electrophoresis stained with ethidium bromide to verify the presence or the absence of *GSTM* and *GSTT* fragments and the *GSTP1* product was used as control for this reaction. A second aliquot of the amplified *GSTP1* product was digested with *Bsm*I, the genotypes were resolved using a 8% acrilamide gel stained with silver nitrate.

2.7.2. CYP2A6*9 (-48T>G) Polymorphism

The *CYP2A6*9* (-48T>G) polymorphism was genotyped by allele-specific PCR using the method developed by Schoedel *et al.* (2004). The genotypes were resolved using an agarose gel (3%) stained with ethidium bromide.

2.7.3. PON1Gln192Arg Polymorphism

The *PON1Gln192Arg* polymorphism (location: 7q21.3) was genotyped by PCR/RFLP, according to the description published by Humbert *et al.* (1993). An aliquot of the PCR product was digested with *AlwI*, and the genotypes were resolved using an agarose gel (3%) stained with ethidium bromide.

2.7.4. OGG1Ser326Cys Polymorphism

The *OGG1Ser326Cys* polymorphism (location: 3p26.2) was genotyped using the primers and the PCR conditions indicated by De Ruyck *et al.* (2005). An aliquot of the PCR product was digested with *Alw I*, and the genotypes were resolved using a 3% agarose gel stained with ethidium bromide.

2.7.5. XRCC1Arg194Trp Polymorphism

The *XRCC1Arg194Trp* polymorphism (location: 19q13.2) was genotyped by PCR/RFLP according to Lunn *et al.* (1999). The *XRCC1194Arg* and *XRCC1 194Trp* alleles were detected after digestion with *PvuII* enzyme, and the genotypes were resolved using a 3% agarose gel stained with ethidium bromide.

2.7.6. *RAD51G135C* Polymorphism

The *RAD51G135C* polymorphism was genotyped using the primers and the PCR conditions indicated by Wang *et al.* (2001). An aliquot of the PCR product was digested with *BsrDI*, and the genotypes were resolved using a 3% agarose gel stained with ethidium bromide.

2.7.7. *XRCC4Ile 401Thr* Polymorphism

The *XRCC4*Ile 401Thr* polymorphism was genotyped using the primers and the PCR conditions indicated by Relton *et al.* (2004). An aliquot of the PCR product was digested with *BstNI*, and the genotypes were resolved using a 3% agarose gel stained with ethidium bromide.

2.8. Statistical analysis

The normality of variables was evaluated by the Kolmogorov–Smirnov test. T-tests were used to compare the demographic characteristics of study populations. The statistical analysis of differences between Comet assay and Micronucleus test results was carried out using the non-parametric Mann Whitney (for independent samples) or Wilcoxon Test (for correlated samples); for oxidative stress parameters and trace elements levels was carried out using paired (for correlated samples) and unpaired (for independent samples) t-test. The statistical differences between PPE use were analyzed using the nonparametric two-tailed Kruskal-Wallis test with the Dunn correction for multiple comparisons. Allelic frequencies were estimated by gene counting. For comparisons among allelic and genotype frequencies and agreement of genotypic frequencies with Hardy–Weinberg expectations the χ^2 test and the Chi-square test were employed. Spearman's test was used to analyze

data correlations as appropriate. The critical level for rejection of the null hypothesis was considered to be a P value of 5%, two-tailed. All analyses were performed with the SPSS/PC statistical software.

3. Results

The general characteristics of the study groups are summarized in Table 1. The distribution of age and smoking habit of the subjects from both groups were similar (unpaired t-test). The duration of exposure ranged from 4 to 56 years, the mean being 29.96 ± 15.47 years.

A significant increase in DNA damage, assessed by Comet assay, was observed in tobacco farmers when compared with the non-exposed group ($P < 0.001$ – Mann Whitney test) and in leaf harvest when compared with the pesticide application group ($P < 0.05$ – Wilcoxon test) (Table II). In Cytokinesis-blocked human lymphocyte MN test (CBMN test), the difference was higher in leaf harvest group too. Significant difference in micronuclei (MN) and nucleoplasmic bridge frequency (NPB) ($P < 0.05$) was found in pesticide application group in relation to non-exposed group. MN ($P < 0.001$), nuclear buds (NBUD) ($P > 0.05$) and NPB ($P < 0.001$) frequencies were significantly increased in leaf harvest, compared to the non-exposed group and NBUD frequency compared to pesticide application group ($P < 0.05$) (Table II).

No statistically significant difference was found between genders and exposure time for all parameters analyzed (data not shown). No difference was observed in hematocrit values (40.91 ± 4.99 for non-exposed individuals; 41.22 ± 4.78 for pesticide application and 42.46 ± 3.56 for leaf harvest) between the groups. Correlation was observed in age and CBMN test results in non-exposed and pesticide application group (Figure 1). In

relation to personal protective equipment (PPE) use, MN frequency increased in pesticide application was observed ($P < 0.05$) (Figure 2).

PON1, *CYP2A6*, *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*, *OGG1*, *XRCC1*, *XRCC4* and *RAD51* genotype frequencies of subjects studied are shown in Table III. No deviations from Hardy–Weinberg expectations were detected (Chi-square test) and the frequency of genotypes detected in our study is similar to those previously described by Vasconcelos *et al.* (2005) and Da Silva *et al.* (2008).

Table IV and V demonstrated the effect of individual of genetic polymorphisms in xenobiotic-metabolising and DNA repair enzymes genes, respectively, on different results of Comet assay and CBMN test evaluated in the exposed and non-exposed groups. In the non-exposed group higher values of NBUD frequency for *GSTM1* non-null individuals was observed; MN frequency in *RAD51 G/C* or *C/C* individuals and NPB frequency in *XRCC4 Ile/Ile* individuals were also higher in relation to variant (heterozygous and/or homozygous) genotype from the same group ($P < 0.05$, Mann Whitney test). Increase in NBUD frequency in *GSTM1* null individuals was observed during pesticide application ($P < 0.001$) and NPB frequency in *CYP2A6 *1/*1* individuals in the leaf harvest group ($P < 0.05$).

Table VI shows trace elements content in serum samples of the non-exposed and exposed groups. In pesticide application, chromium (Cr), magnesium (Mg), aluminum (Al), chlorine (Cl), zinc (Zn) and potassium (K) values were increased when compared to the non-exposed or leaf harvest groups.

The results of oxidative stress markers in groups are shown in Table VII. The superoxide dismutase (SOD) activity presented a significant increase in exposed groups (pesticide application and leaf harvest) in relation to non-exposed group ($P < 0.001$); and

pesticide application presented higher values than leaf harvest group ($P < 0.01$). The catalase (CAT) activity and TBARS presented a significant increase in leaf harvest when compared to non-exposed group and pesticide application.

4. Discussion

Tobacco is cultivated over a large area in southern Brazil, and most of the tobacco farm workers are at risk due to careless handling of pesticides and tobacco leaf during harvest. Genotoxic potential is a primary risk factor for long-term effects, such as carcinogenic and reproductive toxicology and degenerative diseases, thus biomonitoring studies focusing on genomic modifications have been carried out in pesticide exposed populations (Bolognesi *et al.*, 2011).

Our study, showing that DNA damage was three times higher in the pesticide application and four times greater in the leaf harvest groups. These data suggest that the rural workers in our study had been exposed to genotoxic components of pesticides and tobacco leaf. The Comet assay has been used to determine the extent of DNA damage in the lymphocytes of farm workers with occupational exposure to a complex mixture of pesticides (Garaj-Vrhovac and Zeljezic, 2001; Muniz *et al.*, 2008; Paiva *et al.*, 2011). In relation to the cytokinesis-block micronucleus (CBMN) assay, used to measure micronuclei (MN), nucleoplasmic bridges (NPBs) and nuclear buds (NBUDs), higher frequency of NPB and MN were detected between the pesticide application and leaf harvest groups, and higher frequencies of NPB were obtained for the farmers. These results indicate a possible chromosomal rearrangement due to pesticides exposure. In addition, with respect to NBUD frequencies, the farmers presented a statistically significant higher frequency than pesticide application and non-exposed group only in leaf harvest group.

NBUD refer to the measurement of gene amplification (Fenech, 2006). Shimizu *et al.* (2005) has shown that amplified DNA is selectively settled at the periphery of main nuclei and is eliminated via nuclear budding. This finding suggests that in addition to clastogenic and/or aneugenic effects, tobacco leaf exposure also induces gene amplification in the farmers.

This study demonstrates, in tobacco farmers cells, a significant genotoxic effect in DNA damage (Comet assay) and mutagenic effect (CBMN assay) during pesticides application, which is consistent with others reports (Garaj-Vrhovac and Zeljezic, 2001; Da Silva *et al.*, 2008; Muniz *et al.*, 2008; Paiva *et al.*, 2011). Pesticide sprayers are the most frequently exposed group of agricultural workers, with positive findings obtained in 18 of 27 studies, presenting 1.12-7.67 higher exposure rates than other workers (Bolognesi, 2003). Workers employed in pesticide production and farmers who use pesticides have a higher risk of exposure and hence are more prone to the potential health effects of pesticides (Sailaja *et al.*, 2006; Bolognesi *et al.*, 2011). Increased frequencies of MN and NBUD were also found in farmers exposed to pesticides in Turkey (Coskun *et al.*, 2011), and significant increase in DNA damage, assessed by Comet assay, and frequency of micronuclei, nuclear buds and nucleoplasmic bridges was found in human lymphocytes exposed to glyphosate *in vitro* (Mladinic *et al.*, 2009). In addition, many pesticides used extensively in tobacco leaves are metal-based formulations, including Mg, Al, Cl, Zn, and Br (Arnal *et al.*, 2011), which are associated with DNA damage. In tobacco farmers' whole blood samples, analyzed in our study, levels of these metals were increased in the pesticides application group, which only confirm exposure to these chemicals. Phosphate fertilizers, which are used in tobacco cultivation, also contain high concentration of the metals (Golia *et al.*, 2007). Soil samples collected from the surface horizon and composite

leaf samples of cured tobacco were analyzed for total Zn, Cu, Mn, Fe, Pb, Ni and Cd concentrations, and significant increases were observed for all metals (Adamu *et al.*, 1989; Da Silva *et al.*, *in prep*).

In relation to DNA damage in leaf harvest group, they came into contact with green tobacco leaves and tobacco plants during the various tobacco cultivation process and absorbed nicotine through the skin. Several studies have described the acute health effects of nicotine toxicity in tobacco workers (Schmitt *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2010). Genotoxic effects induced by tobacco leaves were investigated only in *Mus musculus*, where positive results were found (Da Silva *et al.*, 2010). In another study, using the same farm workers group an increase in cotinine level during leaf harvest was observed, which confirms exposure to nicotine for this group (Da Silva *et al.*, *in prep*). Nicotine has been implicated in free radical generation human cells, directly addressing the relationship between ROS induction and the observed DNA damage (Wetscher *et al.*, 1995)

The toxicity of many xenobiotics is associated with the production of free radicals, which are not only toxic themselves, but are also implicated in the pathophysiology of many diseases (Abdollahi *et al.*, 2004). Pesticides, synthetic and natural, may induce oxidative stress, leading to generation of free radicals and alteration in antioxidants, oxygen free radicals, the scavenging enzyme system, and lipid peroxidation (Banerjee *et al.*, 1999; Shadnia *et al.*, 2005; Salvador *et al.*, 2008). In pesticide application group, solely antioxidant enzyme superoxide dismutase (SOD) had increased activity, being higher than non-exposed and leaf harvest groups. In leaf harvest group more body-defending antioxidant mechanisms were recruited to overcome the induction of oxidative stress, SOD and catalase (CAT). Results also indicate that the level of lipid peroxidation in the leaf harvest group was significantly different from that in non-exposed and pesticide

application groups. This indicates that the stimulation of body antioxidant was not successful enough to scavenge free radicals and overcome lipid peroxidation. Nicotine has also been implicated in free radical generation in rodent and human cells of various types, directly addressing the relationship between ROS induction and the observed DNA damage (Wetscher *et al.*, 1995; Yildiz *et al.*, 1999; Da Silva *et al.*, 2010). The toxicity of nicotine depends on the amount of nicotine absorbed.

The increase in MN with age was observed for both groups, exposed and non-exposed. Fenech and Bonassi (2011) affirm that this increase is likely due to a combination of factors which include the cumulative effect of acquired mutations in genes involved in DNA repair, chromosome segregation and cell cycle checkpoint.

Our study demonstrated that PPE use influenced the results obtained by MN test in pesticide application group, where significant differences were shown between workers who declared that they had used complete protective clothing and those who did not. Controversial results are found in relation to PPE use and DNA damage reduction. Different studies (Dulout *et al.*, 1985; Lander and Ronne, 1995; Shaham *et al.*, 2001) demonstrated that the use of mask and gloves seems to protect the workers by reducing the incidence of cytogenetic outcomes during pesticide application (Da Silva *et al.*, 2008; Remor *et al.*, 2009).

No statistically significant difference was found in this study for hematocrit values between the tobacco farmers and non-exposed subjects. Some researchers have reported that subjects exposed to pesticides can present hematological alterations (i.e. anaemia) (Pastor *et al.*, 2002; Abu Mourad, 2005; Lu, 2009), but other studies did not show significant differences between control and exposed groups (Pastor *et al.*, 2002; Remor *et*

al., 2009). In relation to tobacco leaves, no effect was found in hematocrit values in mice (Da Silva *et al.*, 2010).

From the nine markers of individual susceptibility studied in this paper, only *GSTM1*, *CYP2A6*, *RAD51* and *XRCC4* genes polymorphism showed significant associations with CBMN assay results. No association was found with Comet assay results.

Human serum paraoxonase (PON1) is a lactonase with esterase activity that breaks down acetylcholinesterase inhibitors like organophosphate pesticides before binding with cholinesterase (Singh *et al.*, 2011b), helping the detoxification of the activated oxon of organoposphate (Humbert *et al.*, 1993). Reports have provided strong evidence that pesticide exposure is associated with significantly higher DNA damage in the wild-type genotype for the *PON1* (*Gln192Arg*) polymorphism (Da Silva *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2011b), but no association with long-term exposure in tobacco farmers was found (Sozmen *et al.*, 2007). No significant difference was observed in our study. Maybe organophosphate and carbamate pesticides are used in smaller quantities by tobacco farmers than by other farmers who took part in previous studies.

There is no research about *CYP2A6**9 polymorphism gene in association to DNA damage. Kiyotani *et al.* (2003) suggest that the -48T to G nucleotide substitution in the promoter region of the *CYP2A6* gene decreases the expression of mRNA. The transcriptional significance of the *CYP2A6**9 polymorphism suggests that *in vivo* levels of *CYP2A6* protein is decreased in subjects carrying this allele (Pitarque *et al.*, 2001), having the enzymatic activity about half that of the wild type (*CYP2A6**1/*1). Our study recorded evidence that nicotine exposure (leaf harvest group) was associated with significantly higher NPB in the *CYP2A6**1/*1 individuals. *CYP2A6**9 subjects possessed lower rates of coumarin and nicotine metabolism (Peamkrasatam *et al.*, 2006). Maybe the normal

metabolism of nicotine can be inducing DNA damage. Nicotine iminium ion, nicotine's metabolite, has received considerable interest since it is an alkylating (Hukkanen *et al.*, 2005). Individuals carrying inactive or reduced-activity CYP2A6 phenotypes have been reported as being at a lower risk for tobacco-related cancer (Ariyoshi *et al.*, 2002; Tamaki *et al.*, 2011) although conflicting results have also been observed (Loriot *et al.*, 2001).

Glutathione S-transferase (GST) is a family of enzymes representative of the phase II metabolism pathway. Polymorphisms in *GSTM1*, *GSTT1* and *GSTP1* are widely studied in relation to exposure to various genotoxic agents; however, the results are inconsistent and contradictory (Dhillon *et al.*, 2011). *GSTM1* null polymorphism was associated with significant variation in the frequency of NBUD of the different groups. *GSTM1* non-null present NBUD frequency increased in non-exposed group and *GSTM1* null in pesticide application group. In previous studies, this polymorphism was not associated with significant variation in the frequencies of chromosomal aberration, sister chromatid exchange and MN in unexposed control persons (Uuskula *et al.*, 1995; Scarpato *et al.*, 1996). However, some authors (Falck *et al.*, 1999; Laffon *et al.*, 2002; Leopardi *et al.*, 2003) showed increased MN frequencies in *GSTM1* non-null in non-exposed groups, irrespective of exposure. Polymorphisms of xenobiotic-metabolizing enzymes may also influence the baseline level of chromosome damage (Norppa, 2004). When a *GSTM1* null genotype is detected, it is impossible to metabolize some activated carcinogens, which increase the risk of DNA damage and may lead to cancer development (Wu *et al.*, 1997). The lack of *GSTM1* appears also to be associated with an increased sensitivity to tobacco-smoking genotoxicity (Norppa, 2004). Jiang *et al.* (2010) and Singh *et al.* (2011a) also observed association of *GSTM1* null genotype and DNA damage, as in pesticide application group. No association was found with DI, FD and MN, as observed in vineyard

workers (Da Silva *et al.*, 2008). We did not observe any significant association between null deletion of *GSTT1* and *GSTP1* with DNA damage which is in agreement with other studies performed on workers exposed to pesticides (Da Silva *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2011a).

In our study, no association was found in *OGG1*, *XRCC1*, *XRCC4*, and *RAD51* genes polymorphisms with Comet assay and CBMN assay results for exposed groups. The OGG1 protein catalyzes the excision of oxidized purines, including 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxoG) and ring-opened purines (Dizdaroglu, 2005). The XRCC1 protein plays an important role in the BER pathway, acting as a scaffold to coordinate other BER proteins, such as DNA polymerase β , DNA ligase III, and poly-ADP-ribose polymerase (PARP) (Frosina, 2004). Different polymorphisms have been reported in the *XRCC4* gene (Ford *et al.*, 2000). One of these, the *XRCC4 Ile* \rightarrow *Thr* polymorphism at codon 401, is the subject of investigation in the current study. Human RAD51, a homologue of bacterial RecA protein, is required for meiotic and mitotic recombination and plays a central role in homology-dependent recombinational repair of double-strand breaks (DSBs) (Poplawski *et al.*, 2006). Other studies with *OGG1* and *XRCC1* polymorphism revealed no effect on the studied biomarkers of exposure and effect (Wong *et al.*, 2008; Rohr *et al.*, 2011).

Genotype differences in the exposed group that are not seen in the non-exposed group suggest exposure-specific genotype effects. Genotype effects seen (at the same level) in both the exposed and the non-exposed or only in the non-exposed probably represent genotype effects on the baseline level of the cytogenetic biomarker (Norppa, 2004). In our study, non-exposed group presented increased association between *XRCC4 Ile/Ile* and NPB, and between *RAD51 G/C or C/C* and MN. Maybe these variants could

influence individual DNA repair capacity by interacting with lifestyle factors in healthy subjects. Lifestyle determines the level of exposure to environmental carcinogens/mutagens in healthy populations unexposed to occupational factors (Weng *et al.*, 2008). Polymorphisms affecting fundamental cellular processes responsible for maintaining the genomic integrity, such as DNA repair, could be expected to have this kind of effect (Norppa, 2004). Studies demonstrated that environmental exposures may down-regulate expression of some DNA repair genes for *XRCC1* (Weng *et al.*, 2008). However, these results are more likely due reduced samples observed in non-exposed group.

Finally, this investigation suggests that DNA damage increases, analyzed by Comet and CBMN assays, at different tobacco harvest stages (pesticides application and tobacco leaf harvest). Effect of individual genotype of the metabolism genes on the level of different biomarkers evaluated in exposed group demonstrated an influence on increase in damage of *GSTM1* null in pesticides application group, and a influence of *CYP2A6*1/*1* on tobacco leaf harvest group. Individual genotype of the DNA repair genes of exposed groups did not demonstrate influence on the different biomarkers analyzed in this study. In pesticide application, an increase in trace elements content (chromium, magnesium, aluminum, chloride, zinc and potassium) was found, when compared to non-exposed and leaf harvest group. The results also indicated that chronic exposure to pesticides, synthetic and natural, can influence antioxidant enzymes activity. Our study drives the attention once more to the need for occupational training on safe working practices and safe work environment for farm workers. Developing countries should use such data to establish safety occupational rules during the use of pesticides and mainly during tobacco leaf harvest.

Funding

Funding for this project was provided by the Brazilian Reserch Agency (CNPq), Conselho Nacional para o Desenvolvimento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

Acknowledgements

The authors thank the farmers who participated in this study, the Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS) and the Lutheran University of Brazil (ULBRA) for their support, as well as the Technical and Agricultural Assistance Extension Institute (EMATER, RS) for their collaboration.

Reference

- Abdollahi, M., Ranjbar, A., Shadnia, S., Nikfar, S., Rezaie, A., 2004. Pesticides and oxidative stress: a review. *Med Sci Monit* 10, RA141-147.
- Abu Mourad, T., 2005. Adverse impact of insecticides on the health of Palestinian farm workers in the Gaza Strip: a hematologic biomarker study. *Int J Occup Environ Health* 11, 144-149.
- Adamu, C.A., Bell, P.F., Mulchi, C., Chaney, R., 1989. Residual metal concentrations in soils and leaf accumulations in tobacco a decade following farmland application of municipal sludge. *Environ Pollut* 56, 113-126.
- Aebi, H., 1984. Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol* 105, 121-126.
- Alves, J., Silva, F.R., Salvador, M., Kvitko, K., Rohr, P., Henriques, J.A.P., da Silva, J., *in preparation*. Occupational Exposure and Evaluation of genotoxicity in tobacco farmers.
- Arcury, T.A., Quandt, S.A., Preisser, J.S., Bernert, J.T., Norton, D., Wang, J., 2003. High levels of transdermal nicotine exposure produce green tobacco sickness in Latino farmworkers. *Nicotine Tob Res* 5, 315-321.
- Ariyoshi, N., Miyamoto, M., Umetsu, Y., Kunitoh, H., Dosaka-Akita, H., Sawamura, Y., 2002. Genetic polymorphism of *CYP2A6* gene and tobacco induced lung cancer risk in male smokers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11, 890-894.
- Arnal, N., Astiz, M., de Alaniz, M.J., Marra, C.A., 2011. Clinical parameters and biomarkers of oxidative stress in agricultural workers who applied copper-based pesticides. *Ecotoxicol Environ Saf* 74, 1779-1786.
- Banerjee, B.D., Seth, V., Bhattacharya, A., Pasha, S.T., Chakraborty, A.K., 1999. Biochemical effects of some pesticides on lipid peroxidation and free-radical scavengers. *Toxicol Lett* 107, 33-47.
- Bannister, J.V., Calabrese, L., 1987. Assays for superoxide dismutase. *Methods Biochem Anal* 32, 279-312.
- Bolognesi, C., 2003. Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. *Mutat Res* 543, 251-272.
- Bolognesi, C., Creus, A., Ostrosky-Wegman, P., Marcos, R., 2011. Micronuclei and pesticide exposure. *Mutagenesis* 26, 19-26.
- Bull, S., Fletcher, K., Boobis, A.R., Battershill, J.M., 2006. Evidence for genotoxicity of pesticides in pesticide applicators: a review. *Mutagenesis* 21, 93-103.
- Campbell, J.L., Hopman, T.L., Maxwell, J.A., Nejedly, Z., 2000. The Guelph PIXE software package III: alternative proton database. *Nuclear Instrumentas and Methods in Physics Research Section B* 170, 193-204.
- Carrano, A.V., Natarajan, A.T., 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.
- Collins, A.R., 2004. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol* 26, 249-261.
- Coskun, M., Cayir, A., Ozdemir, O., 2011. Frequencies of micronuclei (MNI), nucleoplasmic bridges (NPBs), and nuclear buds (NBUDs) in farmers exposed to pesticides in Canakkale, Turkey. *Environ Int* 37, 93-96.
- Da Silva, F., da Silva, J., Nunes, E., Benedetti, D., Kahl, V., Rohr, P., Abreu, M.b., Thiesen, V.f., Kvitko, K., *in preparation*. Buccal Micronucleus Cytome Assay and

- Genetic Polymorphism for *PON1* and *CYP2A6**9 in Biomonitoring with Tobacco Farmers.
- Da Silva, F.R., da Silva, J., Dalpiaz, T., Nunes, E., Ferraz, A., Martins, T., Dias, J.D., Rosa, D., Porawskie, M., Bona, S., Erdtmann, B., *in preparation*. Genotoxicity effect of *Nicotiana tabacum* leaves on *Helix aspersa*.
- Da Silva, F.R., Erdtmann, B., Dalpiaz, T., Nunes, E., Da Rosa, D.P., Porawski, M., Bona, S., Simon, C.F., Da, C.A.M., Da Silva, J., 2010. Effects of dermal exposure to *Nicotiana tabacum* (Jean Nicot, 1560) leaves in mouse evaluated by multiple methods and tissues. *J Agric Food Chem* 58, 9868-9874.
- Da Silva, J., Moraes, C.R., Heuser, V.D., Andrade, V.M., Silva, F.R., Kvitko, K., Emmel, V., Rohr, P., Bordin, D.L., Andreazza, A.C., Salvador, M., Henriques, J.A., Erdtmann, B., 2008. Evaluation of genetic damage in a Brazilian population occupationally exposed to pesticides and its correlation with polymorphisms in metabolizing genes. *Mutagenesis* 23, 415-422.
- De Ruyck, K., Van Eijkeren, M., Claes, K., Morthier, R., De Paepe, A., Vral, A., De Ridder, L., Thierens, H., 2005. Radiation-induced damage to normal tissues after radiotherapy in patients treated for gynecologic tumors: association with single nucleotide polymorphisms in *XRCC1*, *XRCC3*, and *OGG1* genes and *in vitro* chromosomal radiosensitivity in lymphocytes. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 62, 1140-1149.
- Dhillon, V.S., Thomas, P., Iarmarcovai, G., Kirsch-Volders, M., Bonassi, S., Fenech, M., 2011. Genetic polymorphisms of genes involved in DNA repair and metabolism influence micronucleus frequencies in human peripheral blood lymphocytes. *Mutagenesis* 26, 33-42.
- Dizdaroglu, M., 2005. Base-excision repair of oxidative DNA damage by DNA glycosylases. *Mutat Res* 591, 45-59.
- Dulout, F.N., Pastori, M.C., Olivero, O.A., Gonzalez Cid, M., Loria, D., Matos, E., Sobel, N., de Bujan, E.C., Albiano, N., 1985. Sister-chromatid exchanges and chromosomal aberrations in a population exposed to pesticides. *Mutat Res* 143, 237-244.
- Falck, G.C., Hirvonen, A., Scarpato, R., Saarikoski, S.T., Migliore, L., Norppa, H., 1999. Micronuclei in blood lymphocytes and genetic polymorphism for *GSTM1*, *GSTT1* and *NAT2* in pesticide-exposed greenhouse workers. *Mutat Res* 441, 225-237.
- Fenech, M., 1993. The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutat Res* 285, 35-44.
- Fenech, M., 2006. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a "cytome" assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. *Mutat Res* 600, 58-66.
- Fenech, M., Bonassi, S., 2011. The effect of age, gender, diet and lifestyle on DNA damage measured using micronucleus frequency in human peripheral blood lymphocytes. *Mutagenesis* 26, 43-49.
- Fenech, M., Morley, A., 1985. Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay. *Cytobios* 43, 233-246.
- Ford, B.N., Ruttan, C.C., Kyle, V.L., Brackley, M.E., Glickman, B.W., 2000. Identification of single nucleotide polymorphisms in human DNA repair genes. *Carcinogenesis* 21, 1977-1981.
- Frosina, G., 2004. Commentary: DNA base excision repair defects in human pathologies. *Free Radic Res* 38, 1037-1054.

- Garaj-Vrhovac, V., Zeljezic, D., 2001. Cytogenetic monitoring of croatian population occupationally exposed to a complex mixture of pesticides. *Toxicology* 165, 153-162.
- Golia, E.E., Dimirkou, A., Mitsios, I.K., 2007. Accumulation of metals on tobacco leaves (primings) grown in an agricultural area in relation to soil. *Bull Environ Contam Toxicol* 79, 158-162.
- Heuser, V.D., Erdtmann, B., Kvitko, K., Rohr, P., da Silva, J., 2007. Evaluation of genetic damage in Brazilian footwear-workers: biomarkers of exposure, effect, and susceptibility. *Toxicology* 232, 235-247.
- Hoffmann, H., Hogel, J., Speit, G., 2005. The effect of smoking on DNA effects in the comet assay: a meta-analysis. *Mutagenesis* 20, 455-466.
- Humbert, R., Adler, D.A., Disteché, C.M., Hassett, C., Omiecinski, C.J., Furlong, C.E., 1993. The molecular basis of the human serum paraoxonase activity polymorphism. *Nat Genet* 3, 73-76.
- Hukkanen, J., Jacob III, P., Benowitz, N.L., 2005. Metabolism and disposition kinetics of nicotine. *Pharmacol Rev* 57, 79-115.
- ICSH, 1980. Recommendation for reference method for determination by centrifugation of packed cell volume of blood. International Committee for Standardization in Haematology Expert Panel on Blood Cell Sizing. *J Clin Pathol* 33, 1-2.
- Jiang, S., Yu, L., Cheng, J., Leng, S., Dai, Y., Zhang, Y., Niu, Y., Yan, H., Qu, W., Zhang, C., Zhang, K., Yang, R., Zhou, L., Zheng, Y., 2010. Genomic damages in peripheral blood lymphocytes and association with polymorphisms of three glutathione S-transferases in workers exposed to formaldehyde. *Mutat Res* 695, 9-15.
- Kiaune, L., Singhasemanon, N., 2011. Pesticidal copper (I) oxide: environmental fate and aquatic toxicity. *Rev Environ Contam Toxicol* 213, 1-26.
- Kimura, K., Yokoyama, K., Sato, H., Nordin, R.B., Naing, L., Kimura, S., Okabe, S., Maeno, T., Kobayashi, Y., Kitamura, F., Araki, S., 2005. Effects of pesticides on the peripheral and central nervous system in tobacco farmers in Malaysia: studies on peripheral nerve conduction, brain-evoked potentials and computerized posturography. *Ind Health* 43, 285-294.
- Kiyotani, K., Yamazaki, H., Fujieda, M., Iwano, S., Matsumura, K., Satarug, S., Ujjiin, P., Shimada, T., Guengerich, F.P., Parkinson, A., Honda, G., Nakagawa, K., Ishizaki, T., Kamataki, T., 2003. Decreased coumarin 7-hydroxylase activities and CYP2A6 expression levels in humans caused by genetic polymorphism in *CYP2A6* promoter region (*CYP2A6*9*). *Pharmacogenetics* 13, 689-695.
- Laffon, B., Pasaro, E., Mendez, J., 2002. Evaluation of genotoxic effects in a group of workers exposed to low levels of styrene. *Toxicology* 171, 175-186.
- Lander, F., Ronne, M., 1995. Frequency of sister chromatid exchange and hematological effects in pesticide-exposed greenhouse sprayers. *Scand J Work Environ Health* 21, 283-288.
- Loriot, M.A., Rebuissou, S., Oscarson, M., Cenée, S., Miyamoto, M., Ariyoshi, N., 2001. Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2A6 in a case-control study on lung cancer in a French population. *Pharmacogenetics* 11, 39-44.
- Leopardi, P., Zijno, A., Marcon, F., Conti, L., Carere, A., Verdina, A., Galati, R., Tomei, F., Baccolo, T.P., Crebelli, R., 2003. Analysis of micronuclei in peripheral blood lymphocytes of traffic wardens: effects of exposure, metabolic genotypes, and inhibition of excision repair in vitro by ARA-C. *Environ Mol Mutagen* 41, 126-130.

- Lu, J.L., 2009. Comparison of pesticide exposure and physical examination, neurological assessment, and laboratory findings between full-time and part-time vegetable farmers in the Philippines. *Environ Health Prev Med*.
- Lunn, R.M., Langlois, R.G., Hsieh, L.L., Thompson, C.L., Bell, D.A., 1999. *XRCC1* polymorphisms: effects on aflatoxin B1-DNA adducts and glycophorin A variant frequency. *Cancer Res* 59, 2557-2561.
- Mladinic, M., Berend, S., Vrdoljak, A.L., Kopjar, N., Radic, B., Zeljezic, D., 2009. Evaluation of genome damage and its relation to oxidative stress induced by glyphosate in human lymphocytes in vitro. *Environ Mol Mutagen* 50, 800-807.
- Muniz, J.F., McCauley, L., Scherer, J., Lasarev, M., Koshy, M., Kow, Y.W., Nazar-Stewart, V., Kisby, G.E., 2008. Biomarkers of oxidative stress and DNA damage in agricultural workers: a pilot study. *Toxicol Appl Pharmacol* 227, 97-107.
- Nadin, S.B., Vargas-Roig, L.M., Ciocca, D.R., 2001. A silver staining method for single-cell gel assay. *J Histochem Cytochem* 49, 1183-1186.
- Norppa, H., 2004. Cytogenetic biomarkers and genetic polymorphisms. *Toxicol Lett* 149, 309-334.
- Oliveira, P.P.V., B., S.C., Moura, L., Malta, D.C., Torres, M.C.A., Lima, S.M.C.P., Lima, A.L.A., Leite, C.E., Costa-e-Silva, V.L., Sobel, J., Lanzieri, T.M., 2010. First reported outbreak of green tobacco sickness in Brazil. *Caderno de Saúde Pública* 26, 2263-2269.
- Onuki, M., Yokoyama, K., Kimura, K., Sato, H., Nordin, R.B., Naing, L., Morita, Y., Sakai, T., Kobayashi, Y., Araki, S., 2003. Assessment of urinary cotinine as a marker of nicotine absorption from tobacco leaves: a study on tobacco farmers in Malaysia. *J Occup Health* 45, 140-145.
- Paiva, J.C., Cabral, I.O., Soares, B.M., Sombra, C.M., Ferreira, J.R., Moraes, M.O., Cavalcanti, B.C., Pessoa, C., 2011. Biomonitoring of rural workers exposed to a complex mixture of pesticides in the municipalities of Tiangua and Ubajara (Ceara state, Brazil): Genotoxic and cytogenetic studies. *Environ Mol Mutagen*.
- Pastor, S., Lucero, L., Gutierrez, S., Durban, R., Gomez, C., Parron, T., Creus, A., Marcos, R., 2002. A follow-up study on micronucleus frequency in Spanish agricultural workers exposed to pesticides. *Mutagenesis* 17, 79-82.
- Peamkrasatam, S., Sriwatanakul, K., Kiyotani, K., Fujieda, M., Yamazaki, H., Kamataki, T., Yoovathaworn, K., 2006. In vivo evaluation of coumarin and nicotine as probe drugs to predict the metabolic capacity of CYP2A6 due to genetic polymorphism in Thais. *Drug Metab Pharmacokinet* 21, 475-484.
- Pitarque, M., von Richter, O., Oke, B., Berkkan, H., Oscarson, M., Ingelman-Sundberg, M., 2001. Identification of a single nucleotide polymorphism in the TATA box of the *CYP2A6* gene: impairment of its promoter activity. *Biochem Biophys Res Commun* 284, 455-460.
- Poplawski, T., Arabski, M., Kozirowska, D., Blasinska-Morawiec, M., Morawiec, Z., Morawiec-Bajda, A., Klupinska, G., Jeziorski, A., Chojnacki, J., Blasiak, J., 2006. DNA damage and repair in gastric cancer--a correlation with the *hOGG1* and *RAD51* genes polymorphisms. *Mutat Res* 601, 83-91.
- Pugh, K.J., Pienkowski, D., Gorczyca, J.T., 2000. Musculoskeletal trauma in tobacco farming. *Orthopedics* 23, 141-143.
- Quandt, S.A., Arcury, T.A., Preisser, J.S., Norton, D., Austin, C., 2000. Migrant farmworkers and green tobacco sickness: new issues for an understudied disease. *Am J Ind Med* 37, 307-315.

- Relton, C.L., Daniel, C.P., Hammal, D.M., Parker, L., Janet Tawn, E., Burn, J., 2004. DNA repair gene polymorphisms, pre-natal factors and the frequency of somatic mutations in the glycophorin-A gene among healthy newborns. *Mutat Res* 545, 49-57.
- Remor, A.P., Totti, C.C., Moreira, D.A., Dutra, G.P., Heuser, V.D., Boeira, J.M., 2009. Occupational exposure of farm workers to pesticides: biochemical parameters and evaluation of genotoxicity. *Environ Int* 35, 273-278.
- Rohr, P., da Silva, J., Erdtmann, B., Saffi, J., Guecheva, T.N., Antonio Pegas 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, 20-27.
- Sailaja, N., Chandrasekhar, M., Rekhadevi, P.V., Mahboob, M., Rahman, M.F., Vuyyuri, S.B., Danadevi, K., Hussain, S.A., Grover, P., 2006. Genotoxic evaluation of workers employed in pesticide production. *Mutat Res* 609, 74-80.
- Salvador, M., Bordina, D.L., Andreazza, A.C., Da Silva, J., Henriques, J.A.P., Erdtmann, B., 2008. Determination of oxidative stress markers and serum cholinesterase among pesticide sprayers in southern Brazil. *Toxicological & Environmental Chemistry* 90, 809-814.
- Scarpato, R., Migliore, L., Hirvonen, A., Falck, G., Norppa, H., 1996. Cytogenetic monitoring of occupational exposure to pesticides: characterization of *GSTM1*, *GSTT1*, and *NAT2* genotypes. *Environ Mol Mutagen* 27, 263-269.
- Schmitt, N.M., Schmitt, J., Kouimintzis, D.M., Kirch, K., 2007. Health risks in tobacco farm workers—a review of the literature. *J Public Health* 15, 255-264.
- Schoedel, K.A., Hoffmann, E.B., Rao, Y., Sellers, E.M., Tyndale, R.F., 2004. Ethnic variation in CYP2A6 and association of genetically slow nicotine metabolism and smoking in adult Caucasians. *Pharmacogenetics* 14, 615-626.
- Shadnia, S., Azizi, E., Hosseini, R., Khoei, S., Fouladdel, S., Pajoumand, A., Jalali, N., Abdollahi, M., 2005. Evaluation of oxidative stress and genotoxicity in organophosphorus insecticide formulators. *Hum Exp Toxicol* 24, 439-445.
- Shaham, J., Kaufman, Z., Gurvich, R., Levi, Z., 2001. Frequency of sister-chromatid exchange among greenhouse farmers exposed to pesticides. *Mutat Res* 491, 71-80.
- Shimizu, N., Shingaki, K., Kaneko-Sasaguri, Y., Hashizume, T., Kanda, T., 2005. When, where and how the bridge breaks: anaphase bridge breakage plays a crucial role in gene amplification and HSR generation. *Exp Cell Res* 302, 233-243.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175, 184-191.
- Singh, S., Kumar, V., Singh, P., Thakur, S., Banerjee, B.D., Rautela, R.S., Grover, S.S., Rawat, D.S., Pasha, S.T., Jain, S.K., Rai, A., 2011a. 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, B.D., Rautela, R.S., Grover, S.S., Rawat, D.S., Pasha, S.T., Jain, S.K., Ichhpujani, R.L., Rai, A., 2011b. Paraoxonase-1 genetic polymorphisms and susceptibility to DNA damage in workers occupationally exposed to organophosphate pesticides. *Toxicol Appl Pharmacol* 252, 130-137.
- Sozmen, B., Peker, S., Kaya, U., Erkan, M., Sozmen, E.Y., 2007. Markers of long-term exposure to organophosphorus pesticides in farmers who work in viticulture and tobacco production in Turkey. *Toxicol Mech Methods* 17, 379-384.

- Tamaki, Y., Arai, T., Sugimura, H., Sasaki, T., Honda, M., Muroi, Y., Matsubara, Y., Kanno, S., Ishikawa, M., Hirasawa, N., Hiratsuka, M., 2011. Association between Cancer Risk and Drug Metabolizing Enzyme Gene (*CYP2A6*, *CYP2A13*, *CYP4B1*, *SULT1A1*, *GSTM1*, and *GSTT1*) Polymorphisms in Japanese Cases of Lung Cancer. *Drug Metab Pharmacokinet*. [Epub ahead of print]
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F., 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 35, 206-221.
- Uuskula, M., Jarventaus, H., Hirvonen, A., Sorsa, M., Norppa, H., 1995. Influence of *GSTM1* genotype on sister chromatid exchange induction by styrene-7,8-oxide and 1,2-epoxy-3-butene in cultured human lymphocytes. *Carcinogenesis* 16, 947-950.
- Vasconcelos, G.M., Struchiner, C.J., Suarez-Kurtz, G., 2005. *CYP2A6* genetic polymorphisms and correlation with smoking status in Brazilians. *Pharmacogenomics J* 5, 42-48.
- Wang, W.W., Spurdle, A.B., Kolachana, P., Bove, B., Modan, B., Ebbers, S.M., Suthers, G., Tucker, M.A., Kaufman, D.J., Doody, M.M., Tarone, R.E., Daly, M., Levavi, H., Pierce, H., Chetrit, A., Yechezkel, G.H., Chenevix-Trench, G., Offit, K., Godwin, A.K., Struwing, J.P., 2001. A single nucleotide polymorphism in the 5' untranslated region of *RAD51* and risk of cancer among *BRCA1/2* mutation carriers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10, 955-960.
- Weng, Z., Lu, Y., Weng, H., Morimoto, K., 2008. Effects of the *XRCC1* gene-environment interactions on DNA damage in healthy Japanese workers. *Environ Mol Mutagen* 49, 708-719.
- Wetscher, G.J., Bagchi, M., Bagchi, D., Perdakis, G., Hinder, P.R., Glaser, K., Hinder, R.A., 1995. Free radical production in nicotine treated pancreatic tissue. *Free Radic Biol Med* 18, 877-882.
- Wills, E.D., 1966. Mechanisms of lipid peroxide formation in animal tissues. *Biochem J* 99, 667-676.
- Wong, R.H., Chang, S.Y., Ho, S.W., Huang, P.L., Liu, Y.J., Chen, Y.C., Yeh, Y.H., Lee, H.S., 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, 168-175.
- Wu, X., Shi, H., Jiang, H., Kemp, B., Hong, W.K., Delclos, G.L., Spitz, M.R., 1997. Associations between cytochrome *P4502E1* genotype, mutagen sensitivity, cigarette smoking and susceptibility to lung cancer. *Carcinogenesis* 18, 967-973.
- Yildiz, D., Liu, Y.S., Ercal, N., Armstrong, D.W., 1999. Comparison of pure nicotine- and smokeless tobacco extract-induced toxicities and oxidative stress. *Arch Environ Contam Toxicol* 37, 434-439.
- Yokoyama, K., 2007. Our recent experiences with sarin poisoning cases in Japan and pesticide users with references to some selected chemicals. *Neurotoxicology* 28, 364-373.

Table I: Evaluation of genetic damage in tobacco farmers: main demographic characteristics of the studied subjects

	Non-exposed group	Exposed group
N° of subjects	56	111
Age (years) [mean ± SD]	43.18 ± 14.96	42.40 ± 14.07
Exposure time (years) [mean ± SD]	-	29.96 ± 15.47
Gender	19 males, 37 females	65 males, 46 females
Smokers^a (%)	3 (5.36)	7 (6.93)
Non-smokers (%)	53 (94.64)	94 (93.07)

S.D.= standard deviation; ^asmoking 20 or more cigarettes per day (Hoffmann *et al.*, 2005).

Table II: Mean values (mean±SD) obtained with the cytogenetic analysis in non-exposed and exposed groups

Groups	Non-exposed	Pesticide application	Leaf harvest
<i>Comet assay</i>	<i>n=56</i>	<i>n=102</i>	<i>n=85</i>
Damage index (DI)	5.91 ± 6.86	17.35 ± 14.40 ^c	23.85 ± 17.70 ^{c,d}
Damage frequency (DF)	4.02 ± 4.65	11.64 ± 9.02 ^c	16.15 ± 11.59 ^{c,d}
<i>Cytokinesis-blocked human lymphocyte MN</i>	<i>n=51</i>	<i>n=89</i>	<i>n=81</i>
Micronuclei (MN)	5.22 ± 3.18	6.83 ± 4.07 ^b	7.75 ± 3.49 ^c
Nuclear buds (NBUD)	8.18 ± 6.02	9.43 ± 6.68	8.86 ± 3.56 ^{a,d}
Nucleoplasmic bridge (NPB)	0.94 ± 1.41	2.46 ± 3.95 ^b	2.42 ± 1.87 ^c

Significant in relation to non-exposed group at ^aP<0.05, ^bP<0.01 and ^cP<0.001 (Mann Whitney Test).

Significant in relation to pesticide application group at ^dP<0.05 (Wilcoxon Test). *n*= number of individuals.

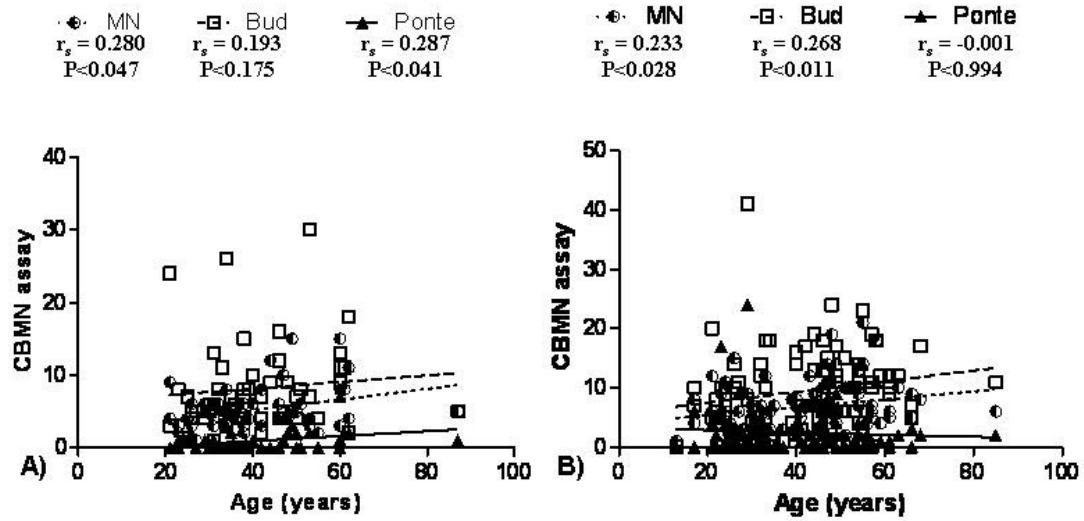


Figure 1: Correlation of the CBMN assay results with age (A) non-exposed group (B) pesticide application group (Spearman' test).

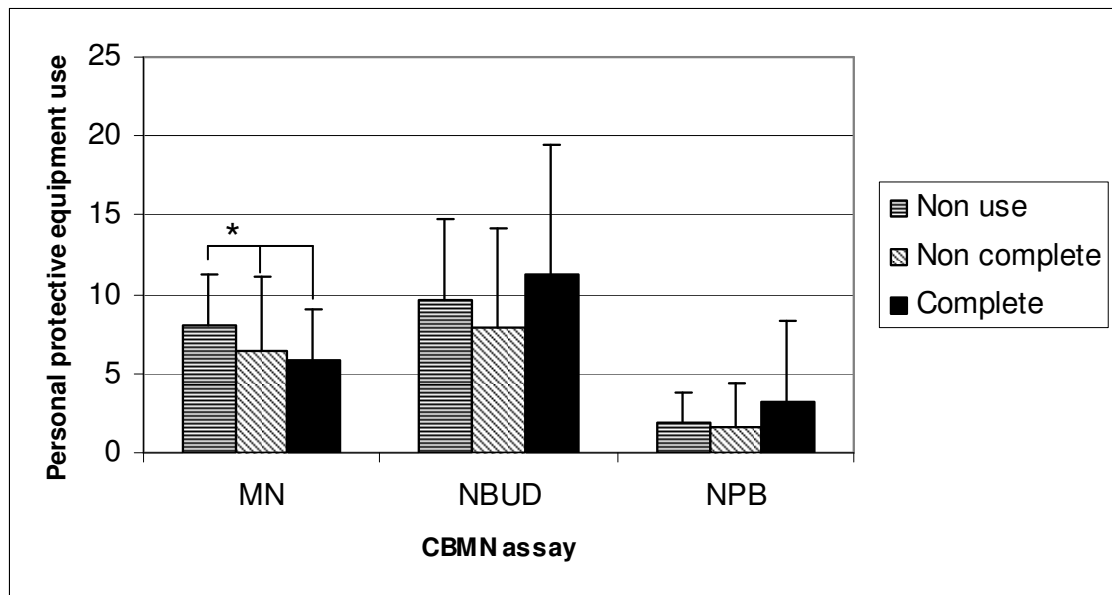


Figure 2: Mean and standard deviation of MN, NBUD and NPB frequency of individuals that no use or non-complete and complete personal protective equipment use in pesticide application group (* $P < 0.05$; Kruskal Wallis test).

Table III: Genotypes distribution and variant alleles frequencies in subjects studied

Genotyped	n (%)
PON1 Gln192Arg	
<i>Gln/Gln</i>	79 (47.31)
<i>Gln/Arg</i>	64 (38.32)
<i>Arg/Arg</i>	24 (14.37)
PON1 192Arg	33.5
CYP2A6*9 (-48T>G)	
1*/1*	130 (86.09)
1*/*9	20 (13.25)
*9/*9	1 (0.66)
CYP2A6*9	7.28
GSTM1	
Non-null	101 (60.12)
Null	67 (39.88)
GSTT1	
Non-null	137 (81.55)
Null	31 (18.45)
GSTP1	
<i>Ile/Ile</i>	79 (47.02)
<i>Ile/Val</i>	70 (41.67)
<i>Val/Val</i>	19 (11.31)
GSTP1 Val	32.1
OGG1 Ser326Cys	
<i>Ser/Ser</i>	112 (70.44)
<i>Ser/Cys</i>	42 (26.42)
<i>Cys/Cys</i>	5 (3.14)
OGG1 326Cys	16.4
XRCC1 Arg194Trp	
<i>Arg/Arg</i>	134 (80.24)
<i>Arg/Trp</i>	33 (19.76)
<i>Trp/Trp</i>	0 (0.0)
XRCC1 194Trp	9.9
XRCC4 Ile401Thr	
<i>Ile/Ile</i>	135 (81.82)
<i>Ile/Thr</i>	28 (16.97)
<i>Thr/Thr</i>	2 (1.21)
XRCC4 401Thr	9.7
Rad51 G135C	
<i>G/G</i>	146 (88.48)
<i>G/C</i>	17 (10.3)
<i>C/C</i>	2 (1.22)
Rad51 135C	6.36

Table IV: Effect of individual genotype of the metabolism genes on the level of different biomarkers evaluated in control and exposed group (mean±SD)

Genotypes	Comet assay (100 leukocytes per subjects)		Cytokinesis-blocked human lymphocyte MN (2000 cell per subjects)		
	DI (n)	DF (n)	MN (n)	NBUD (n)	NPB (n)
Non-exposed					
<i>PON1</i> Gln/Gln	5.78 ± 6.68 (32)	3.78 ± 4.49 (32)	4.93 ± 2.92 (28)	6.61 ± 3.18 (28)	0.89 ± 1.13 (28)
<i>Gln/Arg</i> or <i>Arg/Arg</i>	6.30 ± 7.38 (23)	4.48 ± 5.03 (23)	5.57 ± 3.51 (23)	10.09 ± 7.93 (23)	1.00 ± 1.71 (23)
<i>CYP2A6</i> *9 *1/*1	5.95 ± 6.66 (44)	4.05 ± 4.27 (44)	5.40 ± 2.95 (40)	8.33 ± 5.41 (40)	0.83 ± 1.06 (40)
1*/*9 or *9/*9	8.20 ± 10.64 (5)	5.40 ± 8.79 (5)	7.20 ± 4.66 (5)	6.60 ± 4.78 (5)	1.80 ± 3.03 (5)
<i>GSTM1</i> non-null	8.33 ± 8.80 (24)	5.04 ± 5.81 (24)	5.86 ± 3.29 (22)	8.68 ± 3.98 ^a (22)	0.82 ± 1.68 (22)
null	4.19 ± 4.28 (31)	3.32 ± 3.53 (31)	4.72 ± 3.07 (29)	7.79 ± 7.24 (29)	1.03 ± 1.18 (29)
<i>GSTT1</i> non-null	6.44 ± 7.01 (45)	4.31 ± 4.59 (45)	5.52 ± 3.26 (42)	8.48 ± 6.43 (42)	0.95 ± 1.48 (42)
null	4.00 ± 6.27 (10)	3.00 ± 5.25 (10)	3.78 ± 2.44 (9)	6.78 ± 3.42 (9)	0.89 ± 1.05 (9)
<i>GSTP1</i> Ile/Ile	4.89 ± 4.81 (19)	3.53 ± 3.42 (19)	4.72 ± 2.56 (18)	9.61 ± 8.34 (18)	1.06 ± 1.16 (18)
<i>Ile/Val</i> or <i>Val/Val</i>	6.58 ± 7.77 (36)	4.36 ± 5.26 (36)	5.48 ± 3.48 (33)	7.39 ± 4.22 (33)	0.88 ± 1.54 (33)
Pesticide application					
<i>PON1</i> Gln/Gln	17.17 ± 15.71 (41)	10.95 ± 9.06 (41)	6.63 ± 4.27 (33)	10.58 ± 8.47 (33)	7.94 ± 4.20 (33)
<i>Gln/Arg</i> or <i>Arg/Arg</i>	17.48 ± 13.59 (61)	12.10 ± 9.03 (61)	7.09 ± 3.99 (55)	8.67 ± 5.34 (55)	7.63 ± 2.97 (55)
<i>CYP2A6</i> *9 *1/*1	18.68 ± 15.35 (80)	12.70 ± 9.64 (80)	6.73 ± 4.18 (67)	9.40 ± 6.99 (67)	2.52 ± 4.05 (67)
1*/*9 or *9/*9	14.23 ± 9.51 (13)	9.00 ± 5.07 (13)	6.00 ± 2.89 (12)	8.58 ± 4.56(12)	1.58 ± 1.31 (12)
<i>GSTM1</i> non-null	16.13 ± 12.83 (67)	10.64 ± 7.72 (67)	6.46 ± 3.67 (57)	7.54 ± 6.59 (57)	2.09 ± 3.71 (57)
null	19.69 ± 16.81 (35)	13.54 ± 10.96 (35)	7.45 ± 4.77 (31)	12.77 ± 5.57 ^b (31)	3.19 ± 4.40 (31)
<i>GSTT1</i> non-null	18.39 ± 15.40 (83)	12.45 ± 9.61 (83)	7.19 ± 4.36 (79)	9.51 ± 5.91 (79)	2.33 ± 3.39 (79)
null	12.84 ± 7.54 (19)	8.11 ± 4.42 (19)	5.33 ± 2.40 (18)	8.89 ± 9.37 (18)	3.06 ± 5.84 (18)
<i>GSTP1</i> Ile/Ile	18.50 ± 17.28 (54)	11.54 ± 10.04 (54)	6.83 ± 4.75 (48)	10.19 ± 6.03 (48)	2.40 ± 3.06 (48)
<i>Ile/Val</i> or <i>Val/Val</i>	16.06 ± 10.29 (48)	11.75 ± 7.81 (48)	6.78 ± 3.19 (40)	8.43 ± 7.39 (40)	2.58 ± 4.89 (40)
Leaf harvest					
<i>PON1</i> Gln/Gln	24.89 ± 19.44 (35)	17.97 ± 14.40 (35)	7.94 ± 4.20 (32)	8.81 ± 4.00 (32)	2.56 ± 1.85 (32)
<i>Gln/Arg</i> or <i>Arg/Arg</i>	23.12 ± 16.54 (50)	14.88 ± 9.07 (50)	7.63 ± 2.97 (49)	8.90 ± 3.27 (49)	2.33 ± 1.90 (49)
<i>CYP2A6</i> *9 *1/*1	25.14 ± 17.66 (66)	16.76 ± 11.26 (66)	8.00 ± 3.48 (64)	8.58 ± 3.69 (64)	2.59 ± 1.91 ^a (64)
1*/*9 or *9/*9	23.18 ± 21.66 (11)	18.36 ± 15.29 (11)	7.33 ± 3.84 (9)	8.22 ± 1.56 (9)	1.33 ± 1.00 (9)
<i>GSTM1</i> non-null	22.30 ± 16.56 (56)	16.05 ± 12.59 (56)	7.79 ± 3.69 (52)	8.62 ± 3.36 (52)	2.19 ± 1.77 (52)
null	26.83 ± 19.68 (29)	16.34 ± 9.56 (29)	7.69 ± 3.15 (29)	9.31 ± 3.91 (29)	2.83 ± 2.00 (29)
<i>GSTT1</i> non-null	23.89 ± 16.53 (71)	15.82 ± 9.84 (71)	7.48 ± 3.42 (69)	8.71 ± 3.60 (69)	2.49 ± 1.95 (69)
null	23.64 ± 23.54 (14)	17.86 ± 18.53 (14)	9.33 ± 3.56 (12)	9.75 ± 3.31 (12)	2.00 ± 1.35 (12)
<i>GSTP1</i> Ile/Ile	23.88 ± 17.17 (48)	16.29 ± 11.13 (48)	8.07 ± 3.30 (46)	8.83 ± 3.51 (46)	2.50 ± 1.87 (46)
<i>Ile/Val</i> or <i>Val/Val</i>	23.81 ± 18.61 (37)	15.97 ± 12.31 (37)	7.34 ± 3.73 (35)	8.91 ± 3.65 (35)	2.31 ± 1.89 (35)

^aData significant in relation to variant (heterozygous and/or homozygous) genotype from the same group at P<0.05 and ^bP<0.001 (Mann-Whitney test).

Table V: Effect of individual genotype of the DNA repair genes on the level of different biomarkers evaluated in control and exposed group (mean±SD)

Genotypes	Comet assay (100 leukocytes per subjects)		Cytokinesis-blocked human lymphocyte MN (2000 cell per subjects)		
	DI (n)	DF (n)	MN (n)	NBUD (n)	NPB (n)
Non-exposed					
<i>OGG1 Ser/Ser</i>	4.72 ± 5.61 (36)	3.56 ± 4.06 (36)	4.85 ± 2.88 (33)	8.27 ± 5.89 (33)	0.76 ± 1.09 (33)
<i>Ser/Cys or Cys/Cys</i>	8.25 ± 8.86 (16)	4.81 ± 5.96 (16)	6.13 ± 3.94 (15)	6.27 ± 3.20 (15)	1.20 ± 1.86 (15)
<i>XRCC1 Arg/Arg</i>	5.83 ± 6.45 (52)	3.88 ± 4.14 (52)	5.09 ± 2.91 (48)	8.08 ± 6.16 (48)	0.85 ± 1.13 (48)
<i>Arg/Trp or Trp/Trp</i>	9.00 ± 14.73 (3)	7.33 ± 11.45 (3)	7.67 ± 6.66 (3)	9.67 ± 2.89 (3)	2.33 ± 4.04 (3)
<i>XRCC4 Ile/Ile</i>	5.67 ± 5.71 (36)	3.86 ± 4.06 (36)	5.81 ± 3.38 (36)	7.78 ± 5.81 (36)	1.11 ± 1.49 ^a (36)
<i>Ile/Thr or Thr/Thr</i>	3.60 ± 6.59 (15)	2.13 ± 3.09 (15)	3.86 ± 2.21 (14)	7.64 ± 3.30 (14)	0.29 ± 0.61 (14)
<i>RAD51 G/G</i>	6.29 ± 6.97 (52)	4.25 ± 4.76 (52)	4.96 ± 2.92 (48)	8.38 ± 6.14 (48)	0.94 ± 1.41 (48)
<i>G/C or C/C</i>	1.00 ± 1.00 (3)	1.00 ± 1.00 (3)	11.50 ± 4.95 ^a (2)	4.00 ± 1.41 (2)	1.50 ± 2.12 (2)
Pesticide application					
<i>OGG1 Ser/Ser</i>	16.97 ± 14.68 (69)	10.93 ± 8.11 (69)	6.33 ± 3.85 (60)	9.43 ± 7.21 (60)	2.38 ± 4.31 (60)
<i>Ser/Cys or Cys/Cys</i>	19.03 ± 13.97 (31)	13.71 ± 10.70 (31)	8.00 ± 4.60 (26)	9.31 ± 5.77 (26)	2.69 ± 3.28 (26)
<i>XRCC1 Arg/Arg</i>	18.19 ± 15.80 (73)	12.32 ± 9.98 (73)	7.21 ± 4.40 (61)	9.52 ± 5.90 (61)	2.38 ± 3.50 (61)
<i>Arg/Trp or Trp/Trp</i>	15.24 ± 9.99 (29)	9.93 ± 5.72 (29)	5.89 ± 3.17 (27)	9.07 ± 8.37 (27)	2.71 ± 4.05 (27)
<i>XRCC4 Ile/Ile</i>	17.70 ± 14.91 (90)	11.76 ± 9.25 (90)	6.78 ± 4.06 (77)	9.40 ± 6.98 (77)	2.56 ± 4.08 (77)
<i>Ile/Thr or Thr/Thr</i>	16.80 ± 9.48 (10)	12.10 ± 7.12 (10)	7.33 ± 4.98 (9)	9.33 ± 5.05 (9)	1.78 ± 3.53 (9)
<i>RAD51 G/G</i>	17.81 ± 14.12 (85)	11.99 ± 9.06 (85)	7.14 ± 4.29 (73)	9.58 ± 6.91 (73)	2.56 ± 4.24 (73)
<i>G/C or C/C</i>	10.33 ± 7.06 (15)	7.47 ± 5.41 (15)	5.31 ± 2.21 (13)	7.08 ± 4.75 (13)	2.15 ± 2.49 (13)
Leaf harvest					
<i>OGG1 Ser/Ser</i>	24.51 ± 17.03 (55)	16.15 ± 9.12 (55)	7.76 ± 3.76 (51)	8.31 ± 3.54 (51)	2.39 ± 1.70 (51)
<i>Ser/Cys or Cys/Cys</i>	23.54 ± 19.48 (28)	15.75 ± 14.15 (28)	7.79 ± 3.13 (28)	9.64 ± 3.50 (28)	2.57 ± 2.20 (28)
<i>XRCC1 Arg/Arg</i>	22.73 ± 14.61 (59)	15.29 ± 8.23 (59)	7.43 ± 3.77 (56)	9.13 ± 3.47 (56)	2.43 ± 1.92 (56)
<i>Arg/Trp or Trp/Trp</i>	27.28 ± 23.74 (25)	18.40 ± 17.27 (25)	8.46 ± 2.75 (24)	8.21 ± 3.81 (24)	2.38 ± 1.84 (24)
<i>XRCC4 Ile/Ile</i>	23.73 ± 17.45 (70)	16.33 ± 11.68 (70)	7.69 ± 3.33 (68)	8.76 ± 3.78 (68)	2.40 ± 1.90 (68)
<i>Ile/Thr or Thr/Thr</i>	26.62 ± 20.06 (13)	16.69 ± 11.79 (13)	8.27 ± 4.74 (11)	8.91 ± 1.76 (11)	2.82 ± 1.78 (11)
<i>RAD51 G/G</i>	22.06 ± 16.98 (69)	15.20 ± 11.73 (69)	7.42 ± 3.55 (65)	8.82 ± 3.54 (65)	2.49 ± 1.88 (65)
<i>G/C or C/C</i>	30.87 ± 19.69 (15)	19.53 ± 10.23 (15)	8.80 ± 2.70 (15)	8.80 ± 3.73 (15)	2.07 ± 1.91 (15)

Data significant in relation to variant (heterozygous and/or homozygous) genotype from the same group at ^aP<0.05 (Mann-Whitney test).

Table VI: Content of trace elements (ppm) in the blood samples of the non-exposed and exposed groups (mean \pm SD). *n*= number of individuals

	Non-exposed	Pesticide application	Leaf harvest
Heavy metals	<i>(n=15)</i>	<i>(n=15)</i>	<i>(n=15)</i>
Cr	1.54 \pm 1.75	3.13 \pm 1.03 ^a	0.7 \pm 0.3
Mg	414.31 \pm 415.91	479.35 \pm 378.04 ^a	281.74 \pm 249.25
Al	83.05 \pm 47.31	663.37 \pm 1336.47 [*]	80.68 \pm 51.15
Cl	6628.07 \pm 2800.07	9573.31 \pm 1483.37 ^{***}	8659.20 \pm 4551.19
Zn	33.51 \pm 6.42	160.82 \pm 184.16 ^{***,b}	33.62 \pm 3.55
K	5168.33 \pm 1309.53	5684.63 \pm 508.19 [*]	5746.27 \pm 1928.21
Br	11.56 \pm 7.21	13.02 \pm 7.59	12.69 \pm 8.65
Ni	0.15 \pm 0.52	0.6 \pm 1.03	0.11 \pm 0.3

^{*}Significant difference between pesticide application and non-exposed group at $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ and ^{***} $P < 0.001$ (Mann-Whitney test); ^aSignificant difference between pesticide application and leaf harvest group at $P < 0.05$ and ^b $P < 0.01$ (Wilcoxon test).

Table VII: Results of oxidative stress markers analyzed in non-exposed and exposed groups (mean \pm SD). *n*= number of individuals.

	Non exposed	Pesticide application	Leaf harvest
	<i>(n=14)</i>	<i>(n=49)</i>	<i>(n=30)</i>
TBARS (nmol mL ⁻¹)	5.16 \pm 0.79	5.94 \pm 1.95 ^d	6.23 \pm 1.62 ^b
Superoxide dismutase (USodg ⁻¹ protein)	17.23 \pm 3.67	90.23 \pm 32.39 ^{a,c}	35.73 \pm 13.41 ^a
Catalase (UCatmg ⁻¹ protein)	0.63 \pm 0.44	0.85 \pm 1.12 ^c	3.00 \pm 1.40 ^a

Significant difference in relation at non-exposed group (^aP<0.001, ^bP<0.05 – Mann Whitney test); Significant difference in relation at leaf harvest group (^cP<0.001, ^dP<0.05 – Wilcoxon test).

CAPÍTULO V

V.1 DISCUSSÃO

O Brasil é um dos maiores produtores de tabaco do mundo, sendo que a região Sul se destaca como a principal região produtora no país. Praticada em regime de cultivo familiar, a cultura do tabaco requer trabalho intensivo, além de utilizar grandes quantidades de agrotóxicos para garantir uma folha de boa qualidade (Etges *et al.*, 2002). Neste aspecto o uso de pesticidas em larga escala tem provocado danos à saúde dos agricultores e de suas famílias, como intoxicações agudas e incapacidade para o trabalho, danos ao ecossistema com a contaminação dos alimentos, do solo, da fauna, dos rios além de desmatamento e perda de biodiversidade (Schoenhals *et al.*, 2009).

A maioria desses agrotóxicos pertence a três grupos químicos: organofosforados, carbamatos e piretróides. Os dois primeiros são poderosos inibidores de colinesterase (enzimas fundamentais para o sistema nervoso), podendo ser absorvidos pela pele, por ingestão ou inalação (Deser, 2003). Os organofosforados causam basicamente três tipos de sequelas neurológicas, após uma intoxicação aguda ou devido às exposições crônicas: (1) polineuropatia retardada; (2) síndrome intermediária e (3) efeitos comportamentais. A polineuropatia inclui fraqueza progressiva, perda de coordenação nas pernas, podendo evoluir para paralisia. Os principais sintomas da síndrome intermediária são diarreias intensas e a paralisia dos músculos do pescoço, das pernas e da respiração que ocorrem de forma aguda, podendo levar ao óbito. Dentre os efeitos comportamentais destacam-se: insônia, sono conturbado, ansiedade, retardo de reações, dificuldade de concentração e uma variedade de sequelas psiquiátricas como apatia, irritabilidade, depressão e esquizofrenia (Schoenhals *et al.*, 2009).

Entre fumicultores, verifica-se um maior risco no desenvolvimento de alterações neurocomportamentais as quais podem evoluir para um quadro de depressão e até suicídio. Um estudo realizado em 1996 apresenta fortes indícios de relação entre a utilização de pesticidas organofosforados na fumicultura e o aumento das taxas de suicídio em Venâncio Aires, município localizado no Estado do Rio Grande do Sul e um dos maiores produtores de fumo em folha da região. Uma das observações mais marcantes deste estudo é que mais de 80% dos suicídios no município ocorreram entre pessoas que lidavam com a agricultura.

O estudo também aponta o fato de que em 1995, o coeficiente de suicídio quase duplicou em relação aos dois anos anteriores paralelamente à intensificação do uso de agrotóxicos, passando dos habituais 50 a 60 kg para cerca de 100 kg por hectare, em decorrência de um excessivo número de pragas devido à seca ocorrida neste período (Falck *et al.*, 1999).

Portanto, embora a indústria do tabaco represente uma atividade setorial que gera riqueza, desenvolvimento e emprego para o Brasil, não se pode dizer que esses benefícios sociais se traduzam em melhor qualidade de vida e saúde para os indivíduos envolvidos na produção agrícola – o elo mais vulnerável da cadeia produtiva. Além dos agroquímicos, lidar com a folha do tabaco pode ser tóxico para os trabalhadores, devido à presença da nicotina. A nicotina é responsável pela doença da folha verde que é considerada ocupacional. Esta doença é observada em trabalhadores que manipulam as folhas de fumo molhadas. Os sintomas incluem náusea, vômitos, fraqueza, dor de cabeça, tontura, dores abdominais e dificuldade de respirar, assim como flutuações na pressão sanguínea (Quandt *et al.*, 2000; Parikh *et al.*, 2005; Arcury *et al.*, 2008). Agricultores e profissionais da saúde muitas vezes confundem estes sintomas com cansaço ou envenenamento por agrotóxicos, principalmente se estes tiverem sido aplicados recentemente nas plantações (Quandt *et al.*, 2000).

Pesquisas relacionadas à doença da folha verde são escassas. Elas abordam principalmente a incidência (Arcury *et al.*, 2003), a prevalência (Quandt *et al.*, 2000) e os fatores de risco da doença (Ballard *et al.*, 1995), os sintomas de exposição aguda e crônica à nicotina presente na folha (Parikh *et al.*, 2005), a dosagem de cotinina (o metabólito principal da nicotina) (Onuki *et al.*, 2003), o uso de equipamento de proteção na prevenção da doença (Curwin *et al.*, 2005). Não foram encontrados estudos sobre o potencial genotóxico e mutagênico da exposição a folhas de fumo em humanos. No Brasil, há apenas um estudo envolvendo fumicultores, confirmando a doença da folha verde no país (Oliveira *et al.*, 2010).

O fumo é semeado em maio, transplantado em agosto e setembro e colhido no período de dezembro a fevereiro. Depois de semeadura, as mudas levam cerca de 60 dias para atingir o tamanho ideal para plantio, fase em que o controle de pragas é intensivo. Quando atingem o tamanho ideal, as mudas são transplantadas para a lavoura, já com a área adubada. A colheita é iniciada cerca de 60 dias após o transplante para a lavoura. Nesse período, o fumicultor monitora o crescimento e realiza o controle de pragas e

doenças e aplica o antibrotante nos botões florais. Após a colheita, as folhas ou as plantas são amarradas em varas e levadas para secar em estufas. Após o processo de cura, as folhas são agrupadas em maços e o fumo é armazenado em paióis, onde aguarda a comercialização (Schoenhals *et al.*, 2009).

De acordo com o descrito na literatura, os fumicultores aplicam pesticidas de forma mais intensiva durante os primeiros dois meses da safra e, após o transplante e o crescimento apropriado das folhas do fumo, ocorre a colheita. A colheita é o momento em que o agricultor se expõe à nicotina presente na folha do tabaco. Nos primeiros meses do ano, quando as folhas já estão curadas, é feita a seleção destas de forma manual. Nos meses que seguem, os fumicultores realizam a venda do seu produto.

Considerando os diferentes momentos da safra de fumo, em nosso primeiro estudo avaliamos o risco ocupacional de três períodos distintos: na fase da aplicação intensa de pesticidas, na fase da colheita e na entresafra (fase após a cura das folhas). Para isso, utilizou-se biomarcadores de exposição (ensaio Cometa e dosagem de cotinina) e biomarcadores de efeito (teste de Micronúcleos e avaliação da colinesterase). Foi observado aumento significativo de dano ao DNA, avaliado pelo ensaio Cometa, em fumicultores comparados ao grupo não exposto em todos os períodos da safra e, um significativo aumento nas frequência de células micronucleadas na entresafra. Elevado nível de cotinina foi observado na colheita da folha de fumo, demonstrando exposição à nicotina. Diferente do que esperávamos a atenuação do efeito genotóxico e mutagênico durante o período da entresafra não foi percebida. Ao contrário do nosso estudo, Garaj-Vrhovac e Zeljezic (2001) observaram em trabalhadores que foram retirados da zona de exposição, uma diminuição do dano no DNA avaliado pelo ensaio Cometa. Ao invés disso, indivíduos no momento da entresafra apresentaram dano ao DNA aumentado em relação ao grupo não exposto e ao momento da colheita da folha. Aumento significativo da frequência de MN também foi encontrado em comparação aos indivíduos não expostos.

Este efeito genotóxico e mutagênico provavelmente seja devido, entre outros fatores, ao acúmulo de exposição a pesticidas e nicotina no final da safra. Um estudo feito com viticultores demonstrou maior frequência de MN em comparação aos indivíduos controle um mês após o início da aplicação de pesticidas, mas principalmente no término da safra (Joksic *et al.*, 1997). Na entresafra, muitos agricultores cessam a aplicação de agrotóxicos e a colheita da folha, porém alguns trabalhadores continuam a aplicar pesticidas em outras

culturas. Durante este período, ocorre uma rigorosa seleção das folhas de fumo, onde os trabalhadores separam as não adequadas à venda. Nesta manipulação os agricultores podem estar sofrendo exposição à nitrosaminas específicas do tabaco e a pesticidas e metais que persistiram nas folhas. Nitrosaminas específicas do tabaco são produzidas durante a cura das folhas de fumo (Andersen e Kemp, 1985) sendo que estas são um importante grupo de carcinógenos do tabaco (Hecht e Hoffmann, 1988). Uma quantidade significativa de acefato foi transferida às mãos dos fumicultores depois de repetido contato com numerosas folhas de tabaco, além de aumento nas concentrações de Zn, Cu, Mn, Fe, Pb, Ni e Cd, que foram encontrados nos compostos presentes nas plantas (Adamu *et al.*, 1989; Curwin *et al.*, 2003; Da Silva *et al.*, *in prep*). Assim, trabalhadores envolvidos na safra de fumo podem estar sofrendo exposição constante a diferentes compostos, como resíduos de agroquímicos, nitrosaminas e metais.

Muitos dos pesticidas e fungicidas usados em todo mundo possuem sua formulação a base de cobre, incluindo sulfato de cobre, oxiclreto de cobre e carbonato de cobre. Agroquímicos em geral, e formulações a base de cobre, são responsáveis por alguns efeitos adversos à saúde (Arnal *et al.*, 2011). Estes problemas incluem diferentes tipos de câncer, doenças degenerativas, distúrbios neurológicos, reprodutivos e no sistema imune associados com dano pró-oxidativo (Remor *et al.*, 2009). Alta concentração de Cu foi encontrada em solos da agricultura (Herrero-Hernandez *et al.*, 2011). Outros elementos foram observados em altas concentrações nestes solos, incluindo o Zn (e.g. de inseticidas, de adubo, e aplicação de compostagem) (Ramos, 2006), Pb (e.g. de deposição atmosférica, mas também do uso de arseniato de prata como inseticida) (Rosman *et al.*, 1998; Komarek *et al.*, 2010) e Cd (de fertilizantes fosfatado) (Komarek *et al.*, 2010). Fertilizantes fosfatados, que são usados no cultivo do tabaco, contem altas concentrações de metais (Golia *et al.*, 2007). Amostras de solo coletados da superfície horizontal e amostras de folha de tabaco curado foram analisadas em relação à concentração total de Zn, Cu, Mn, Fe, Pb, Ni e Cd e aumento significativo foi observado para todos os metais (Adamu *et al.*, 1989, Da Silva *et al.*, *in prep*). Em amostras de sangue total em fumicultores, somente no momento da aplicação de pesticidas foi encontrado aumento no conteúdo de elementos traço (cromo, magnésio, alumínio, cloro, zinco e potássio) comparado ao grupo não exposto e ao momento da colheita da folha de fumo. Esta análise não foi realizada no sangue dos fumicultores na entressafra.

De acordo com o observado na entressafra, os fumicultores podem continuamente estar sofrendo exposição ocupacional, não havendo diminuição do dano ao DNA neste período. Assim, nos estudos que seguiram foram incluídos apenas dois momentos da safra: a aplicação intensa de pesticidas e a colheita da folha.

Agrotóxicos são utilizados com intensidade na cultura do tabaco (Etges *et al.*, 2002). Em nosso primeiro estudo foi observado aumento de dano ao DNA durante a fase de aplicação de pesticidas em comparação ao grupo não exposto, pelo ensaio Cometa, porém aumento na frequência de MN não foi encontrado. No segundo e no terceiro estudos envolvendo um número maior de fumicultores, resultados significativos na frequência de micronúcleo (MN), de morte celular e de brotos nucleares (NBUD) foram observados em mucosa oral. Aumento do dano ao DNA, avaliado pelo ensaio Cometa foi três vezes maior em relação aos indivíduos não expostos, além disso, verificou-se aumento na frequência de pontes (NPB) e MN em linfócitos binucleados, indicando efeito aneugênico e/ou clastogênico e um possível rearranjo cromossômico devido à exposição a agrotóxicos. Pesquisas envolvendo a avaliação do risco ocupacional através do ensaio Cometa e do teste de MN em agricultores demonstraram resultados semelhantes (Garaj-Vrhovac e Zeljezic, 2001; Da Silva *et al.*, 2008; Muniz *et al.*, 2008; Paiva *et al.*, 2011). Frequência maior de MN e NBUD foram encontrados em agricultores expostos a pesticidas na Turquia, porém o mesmo não ocorreu na frequência de NPB (Coskun *et al.*, 2011). Schoenhals *et al.* (2009) afirma que 90% dos fumicultores utilizam bomba costal e com isso, no momento da aplicação de pesticida, formam-se aerossóis. Bolognesi (2003) observou que agricultores que aplicam desta forma são mais frequentemente expostos, com resultados positivos obtidos em 18 de 27 estudos, demonstrando 1,12-7,67 taxa de exposição maior do que outros trabalhadores. Agricultores e trabalhadores envolvidos na produção de pesticidas têm risco aumentado de exposição e assim são mais susceptíveis a efeitos adversos a saúde (Sailaja *et al.*, 2006; Bolognesi *et al.*, 2011).

Células da mucosa bucal estão em contato constante com o ambiente, sugerindo que o epitélio oral seja um alvo importante na inalação de xenobióticos; desta forma, é razoável esperar que esse biomarcador possa exibir efeitos mais evidentes durante a manipulação dos agrotóxicos, principalmente se esta aplicação envolver a formação de aerossóis. Os fumicultores, no momento da aplicação de pesticidas, tiveram aumento na frequência de MN em células da mucosa oral, tanto nas células basais como nas diferenciadas em

comparação ao momento da colheita. O mesmo não foi observado no teste de MN em linfócito binucleado. Em mucosa oral, foi possível encontrar frequência maior de células com broto nuclear e células binucleadas em relação ao grupo não exposto. O mecanismo que desencadeia a formação do broto nuclear é desconhecido, mas pode estar relacionado à eliminação do DNA amplificado ou ao reparo de DNA (Shimizu *et al.*, 2005). A precisa significância das células binucleadas não é totalmente entendida, mas pode ser indicativo de falha na citocinese seguido por uma divisão nuclear. Como demonstrado em um estudo envolvendo o ensaio de MN em mucosa oral em indivíduos com Síndrome de Down (Thomas *et al.*, 2008), a razão binucleada/mononucleada pode ser um importante biomarcador de falhas na citocinese, podendo causar aneuploidias em proporção maior. Alteração no número de cromossomos, definido como aneuploidia, pode ser um marcador consistente de possíveis tumores (Sanchez-Siles *et al.*, 2011).

Células com cromatina condensada, células cariorréticas, picnóticas e cariolíticas são biomarcadores de morte celular (Thomas *et al.*, 2009). Estas anomalias são intrínsecas do epitélio escamoso, devido especialmente aos efeitos crônicos do processo mastigatório da mucosa oral e devido à constante ação de agentes mutagênicos (Ramirez e Saldanha, 2002). Célula cariolítica é associada com citotoxicidade, que é também evidente em células necróticas e, célula cariorrética é associada a apoptose (Ramirez e Saldanha, 2002), um processo que sofre controle genético. Aumento de células com cromatina condensada, células cariolíticas e cariorréticas foi observado no grupo exposto a pesticidas em relação ao grupo não exposto, indicando assim aumento de apoptose na mucosa oral destes indivíduos. Esta taxa aumentada de apoptose pode ter desencadeado uma capacidade maior de regeneração deste tecido, pois observamos aumento do número de células basais em comparação ao grupo não exposto. Thomas *et al.* (2009) afirmam que a proporção de células basais e células sofrendo morte celular é um indicativo da capacidade de regeneração do tecido. Tolbert *et al.* (1991) sugerem que apoptose atue como um mecanismo de sobrevivência, eliminando a célula oral com dano genético. Assim, apoptose em excesso pode servir como um biomarcador de efeito genotóxico.

Os compostos pertencentes à categoria dos organofosforados apresentam mecanismo baseado na inibição da colinesterase (Silva *et al.*, 2001). A inibição da colinesterase por meio dos compostos fosforados provoca o acúmulo de acetilcolina, e o organismo passa a apresentar uma série de manifestações (efeitos muscarínicos, efeitos nicotínicos, efeitos

centrais). A atividade de colinesterase é derivada da ação de duas enzimas, uma na membrana dos eritrócitos (colinesterase eritrocitária ou acetilcolinesterase -AChE) e outra sérica (colinesterase plasmática ou butirilcolinesterase -BChE) (Soares *et al.*, 2003). A AChE é sintetizada durante a hematopoese, enquanto a BChE é uma enzima produzida no tecido hepático e exportada continuamente para a corrente sanguínea. Esses dois sistemas enzimáticos apresentam meia-vida bastante diferenciada, ou seja, três meses para AChE e cerca de uma semana para BChE (Silva *et al.*, 2001). Estudos prévios demonstraram associação entre exposição à organofosforados e atividade de colinesterase significativamente reduzida em populações expostas (Panemangalore *et al.*, 1999; Hernandez *et al.*, 2005; Ali *et al.*, 2008; Remor *et al.*, 2009).

Em nossos estudos, tanto no primeiro envolvendo a entresafra como no da mucosa oral, não foram encontrados diferença na atividade da colinesterase entre os indivíduos expostos e não expostos, diferentemente do que foi observado por Khan *et al.* (2008) em um grupo de fumicultores. Em um estudo anterior, Shadnia *et al.* (2005) também encontraram resultados semelhantes aos nossos, principalmente quando a atividade da BChE foi avaliada. Biomarcadores utilizados rotineiramente na avaliação de exposição a pesticidas providenciam informações referentes ao momento da amostragem e provavelmente não refletem exposição ocorrida há algumas semanas atrás (Rohlman *et al.*, 2011). A diminuição do teor da colinesterase plasmática (BChE) é mais rápida do que a das hemácias, após o último contato com os fosforados orgânicos. Essa diferença tem sido proposta como uma forma hábil para diferenciar temporalmente as intoxicações, sendo a AChE para intoxicações crônicas sofridas há mais tempo, e para as mais recentes e agudas, a BChE (Silva *et al.*, 2001). Provavelmente não encontramos inibição na colinesterase nos fumicultores por estes estarem sofrendo exposição crônica. Autores indicam maior habilidade em identificar intoxicações de caráter não recente ou, mais provavelmente, de exposições sucessivas a doses mais baixas avaliando a atividade de AChE e não de BChE, pois AChE apresenta uma menor taxa de renovação sanguínea, podendo revelar de forma integral essas exposições. Conseqüentemente, esse indicador de efeito seria mais apropriado para utilização no monitoramento ocupacional que apresenta este perfil de exposição (baixas doses por longos períodos), ao contrário das intoxicações intencionais com objetivo homicida ou suicida (altas doses em episódios únicos) (Ribeiro e Mella, 2007).

Os trabalhos demonstraram um significativo aumento no ID e FD em fumicultores em relação ao grupo não exposto em todos os momentos da safra, com maior efeito genotóxico na colheita de fumo. Esse resultado foi percebido no primeiro trabalho e, mesmo com uma amostra maior esse efeito manteve-se. Nesses estudos a exposição envolvendo a colheita causou mais dano ao DNA do que a exposição envolvendo a aplicação de pesticidas. Foi observado frequências de MN e NPB significativas, assim como frequência de NBUD. NBUD refere-se a um aumento na eliminação de DNA amplificado, complexo de reparação de DNA e possível excesso cromossômico oriundo de células aneuplóides (Fenech, 2006; Fenech *et al.*, 2011). Shimizu *et al.* (2005) demonstrou que DNA amplificado é seletivamente movido à periferia do núcleo principal e eliminada via brotamento nuclear. Estes resultados sugerem que em adição aos efeitos clastogênicos e/ou aneugênicos, rearranjo cromossômico e amplificação gênica foram induzidos no momento da colheita.

Assim como no momento da aplicação de pesticidas, aumento da frequência de MN (tanto em células basais como em células diferenciadas) e de brotos nucleares em mucosa oral foi observado no momento da colheita. Porém, resultado significativo também foi encontrado em relação à frequência de células binucleadas nesta exposição. Acredita-se que células binucleadas sejam um indicativo de falha na citocinese seguida de divisão celular. Em poucos estudos medindo alterações cromossômicas *in vivo*, nicotina tem sido registrada por interferir na disjunção do cromossomo (Racowsky *et al.*, 1989) - e por induzir aneuploidia e poliploidia em medula óssea de camundongo (Bishun *et al.*, 1972). Talvez os efeitos da exposição durante a colheita possam estar envolvidos no aumento da frequência de células binucleadas comparado ao momento da aplicação de pesticidas.

Além de causar instabilidade cromossômica, a atividade citotóxica da nicotina em várias linhagens celulares foi registrada por alguns autores. Nicotina induziu apoptose pela geração de espécies reativas ao oxigênio (ERO) em fibroblasto humano (Kang *et al.*, 2011) e, em altas doses e em prolongados intervalos, foi citotóxica em medula óssea de camundongo (Attia, 2007b). Em nosso trabalho foi verificado o aumento no número de células cariolíticas, cariorréticas e picnóticas na colheita em relação ao grupo não exposto, mas também frequência maior de células picnóticas e cariorréticas, indicativo de morte celular, em relação ao momento da aplicação de pesticidas. De acordo com este aumento na morte celular, podemos supor que a frequência de células micronucleadas não tenha

sido observada e que o potencial proliferativo tenha sido intensificado, devido também ao aumento no número de células basais. Swenberg (1993) afirma que repetidas exposições a substâncias citotóxicas pode resultar em injúrias crônicas as células, em proliferação celular compensatória, em hiperplasia e em desenvolvimento de tumor. De fato, há correlação entre proliferação celular e indução de câncer (Mally e Chipman, 2002). Assim, dano ao DNA, instabilidade cromossômica, morte celular e potencial regenerativo aumentado, em células da mucosa oral, também foram observados em fumicultores durante a colheita.

Os agricultores envolvidos na plantação do tabaco entram em contato com a folha de fumo verde e absorvem nicotina pela pele. No primeiro estudo, aumento nos níveis de cotinina no sangue dos fumicultores na colheita em relação ao momento da entressafra e ao grupo não exposto foi observado. No trabalho envolvendo a análise de mucosa oral e com um número maior de indivíduos, esse resultado manteve-se em relação ao grupo não exposto. Cotinina é o principal metabólito da nicotina, sendo utilizado como biomarcador pra este tipo de exposição. Sugere-se, então, que houve absorção de nicotina das folhas de fumo pelos agricultores durante o período da colheita. Estudos têm estimado que absorção dermal de nicotina resulte em níveis aumentados de cotinina em fumicultores (Quandt *et al.*, 2000; Arcury *et al.*, 2003; Onuki *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 2010). A toxicidade da nicotina depende da quantidade absorvida. Poucos trabalhos descrevem os efeitos agudos deste pesticida natural em agricultores envolvidos na plantação de fumo (Schmitt *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2010). A nicotina é conhecida por gerar radicais livres em células humanas, relacionando a indução de ERO e dano ao DNA observados (Wetscher *et al.*, 1995). Efeito genotóxico devido à exposição a folhas de fumo foi investigado em *Mus musculus*, onde resultado positivo foi encontrado (Da Silva *et al.*, 2010).

Nas folhas de tabaco, além da nicotina, possivelmente resíduos de pesticidas são observados. Alguns fumicultores usam pesticidas durante a colheita, principalmente glifosato. Compostos contendo glifosato são herbicidas organofosforados com um amplo espectro de ação não seletivo e são extensivamente utilizados no mundo todo (Cavalcante *et al.*, 2008). Embora a toxicidade aguda de glifosato seja considerada baixa (Li e Long, 1988), formulações comerciais contendo glifosato são geralmente mais tóxicas do que a substância pura (Peixoto, 2005) devido principalmente à interferência de surfactantes tais como polietileno amina (Tsui e Chu, 2008). Aumento significativo de dano ao DNA,

avaliado pelo ensaio Cometa, e aumento na frequência de MN, NPB e NBUD foram observados em linfócito humano com exposição *in vitro* a glifosato (Mladinic *et al.*, 2009). Estudos referentes ao uso de pesticidas, principalmente organofosforados, demonstraram que dano ao DNA e estresse oxidativo estão interligados (Lodovici *et al.*, 1997; Muniz *et al.*, 2008).

A toxicidade de muitos xenobióticos está associada à produção de radicais livres, que não são somente tóxicos por si, mas são também implicados na patofisiologia de muitas doenças (Abdollahi *et al.* 2004). Pesticidas podem induzir estresse oxidativo, levando a geração de radicais livres e a alteração de sistemas de enzimas antioxidantes e a peroxidação lipídica (Banerjee *et al.* 1999; Shadnia *et al.* 2005; Salvador *et al.* 2008). No grupo da aplicação de pesticidas, somente a enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD) teve um aumento significativo, tendo maior atividade em relação aos indivíduos não expostos e aos indivíduos da colheita.

No momento da colheita da folha de fumo foi observado estímulo da SOD e da catalase (CAT) na indução de estresse oxidativo. Resultados também indicaram que o nível de peroxidação lipídica foi significativamente maior do que o observado no grupo não exposto e no momento da aplicação de pesticidas. Isto indica que o estímulo da atividade do sistema de enzimas antioxidantes não foi capaz de minimizar a produção de radicais livres, induzindo a peroxidação lipídica.

Outra evidência de que esse tipo de exposição, o qual os fumicultores estão sofrendo, gera estresse oxidativo foi a frequência de danos superior a 10% nas classes tipo 1 e 2 (indicativo de quebra de fita simples) que em geral são descritas como as principais lesões induzidas por esse desequilíbrio (Da Silva *et al.* 2000). EROs podem ser produzidas por íons metais presentes em alguns pesticidas que interferem em distintos passos das diferentes vias do reparo de DNA (Videla *et al.* 2003), por alguns organofosforados (Guilherme *et al.* 2010) e também pela nicotina (Wetscher *et al.* 1995; Yildiz *et al.* 1999; Da Silva *et al.* 2010).

Resultados controversos têm sido observados em relação ao uso de equipamento de proteção individual (EPI) e a redução de dano ao DNA. Em nosso primeiro trabalho não observamos diferença significativa no ID, FD e MN entre os fumicultores que declararam não usar o EPI, os que declararam o uso incompleto e completo. Porém, quando avaliamos a influência do EPI em uma amostra maior, observamos que no momento da aplicação de

pesticidas houve diferença significativa (somente na frequência de MN) entre os trabalhadores que afirmaram não usar o EPI em relação a aqueles que utilizavam o EPI completo ou incompleto. O uso de máscaras e luvas protegeu agricultores por reduzir significativamente os efeitos citogenéticos (Dulout *et al.*, 1985; Lander e Ronne, 1995; Shaham *et al.*, 2001), porém não houve diferença nos resultados obtidos no ensaio Cometa e no teste de MN no grupo de trabalhadores que usavam, ou não, somente um tipo de EPI durante a aplicação de pesticidas (Da Silva *et al.*, 2008; Remor *et al.*, 2009). Em acordo com Da Silva *et al.* (2008), durante a aplicação de questionário individual muitos trabalhadores não declaram corretamente o uso do EPI, variando consideravelmente as respostas em relação a esta informação. Os agricultores reconhecem a importância do uso de equipamento de proteção, mas alguns não usam todos os itens devido à dificuldade em respirar, em se locomover e ao calor excessivo.

Em relação ao tempo de exposição, não encontramos correlação com nenhum parâmetro avaliado em nossos trabalhos. Nosso resultado foi similar ao observado por Paiva *et al.* (2011) onde os níveis de dano ao DNA, estratificado por tempo de exposição, não foi diferente entre os indivíduos das comunidades rurais, mas diferiu significativamente quando comparado ao grupo controle.

Fenech e Bonassi (2011) afirmam que o dano ao DNA aumenta em decorrência da idade provavelmente devido à combinação de vários fatores: o efeito cumulativo de mutações adquiridas em genes envolvidos no reparo, na segregação cromossômica e no *checkpoint* do ciclo celular; as aberrações numéricas e estruturais nos cromossomos causados por exposição à genotoxinas endógenas, a nutrição inadequada, a exposição ocupacional ou ambiental a genotoxinas, bem como a uma ampla variedade de fatores de estilo de vida não saudáveis. Em nosso primeiro trabalho não observamos aumento de dano ao DNA pelo ensaio Cometa e pelo teste de MN. O mesmo ocorreu na avaliação da mucosa oral. Apenas no trabalho envolvendo um número maior de fumicultores encontramos correlação entre idade e a frequência de MN em linfócitos binucleados. Resultados em pesquisas anteriores são controversos, alguns não demonstram efeito da idade (Da Silva *et al.*, 2008; Remor *et al.*, 2009) enquanto outros apresentam resultados positivos (Costa *et al.*, 2006; Battershill *et al.*, 2008).

Devido à existência de divisão do trabalho na lavoura, onde homens têm um contato maior com o tabaco (Quandt *et al.*, 2000), surgiu à hipótese de que haveriam diferenças

entre gênero nos resultados dos biomarcadores. Porém não encontramos diferença entre homens e mulheres em todas as análises realizadas (ensaio Cometa, teste de MN em linfócito binucleado e em mucosa oral, dosagem de BChe, de cotinina e de marcadores do estresse oxidativo, valores de hematócrito e no conteúdo de elementos traço) no grupo não exposto, no período da aplicação de pesticidas e na colheita da folha de fumo. Diferença entre gênero foi observada somente no período da entressafra, onde dano ao DNA foi maior em homens.

Algumas pesquisas têm registrado a possibilidade de alterações hematológicas (i.e. anemia) em indivíduos expostos a pesticidas (Pastor *et al.*, 2002; Abu Mourad, 2005; Lu, 2009) e em peixes expostos ao pó da folha do fumo (Omoniyi *et al.*, 2002). Porém não houve diferença significativa entre os valores do hematócrito dos fumicultores em comparação ao grupo não exposto. Em estudos anteriores envolvendo agricultores, os valores obtidos na avaliação hematológica não demonstraram diferença entre grupo controle e grupo exposto (Pastor *et al.*, 2002; Remor *et al.*, 2009; Alves *et al.*, *in prep.*). Não foi encontrado efeito nos valores de hematócrito em camundongos expostos a folha de fumo (Da Silva *et al.*, 2010).

Diferenças interindividuais na habilidade de ativar e detoxificar substâncias e de reparar dano ao DNA podem explicar a suscetibilidade diferencial à exposição de pesticidas (Bolognesi *et al.*, 2011).

Paraoxonase sérica (PON1) é uma lactonase com atividade de esterase que quebra inibidores da acetilcolinesterase, como organofosforados, antes da ligação com a colinesterase (Singh *et al.*, 2011b), auxiliando na detoxificação destes pesticidas (Humbert *et al.*, 1993). Diferenças individuais de 10-40 vezes na atividade da enzima PON1 foram observadas, sugerindo que indivíduos com níveis baixos de PON1 podem ser mais susceptíveis aos efeitos tóxicos dos organofosforados (Bolognesi, 2003). Polimorfismos de regiões codificadoras e promotoras do gene *PON1* têm sido identificados e podem ajudar a explicar estas diferenças individuais, como o polimorfismo *PON1Gln192Arg* que demonstra atividade maior do alelo *PON1*Arg192* em relação ao *PON1*Gln192* (Humbert *et al.*, 1993). Pesquisas têm evidenciado que exposição a pesticidas está associada com dano ao DNA significativamente maior em indivíduos com o genótipo selvagem do polimorfismo *PON1*192*. Da Silva *et al.* (2008) avaliando um grupo de agricultores de Caxias do Sul expostos a organofosforados demonstrou frequência de MN

significativamente maior em indivíduos homozigotos *Gln/Gln* do que os demais genótipos. Em outro estudo, o aumento no dano ao DNA estimado pelo ensaio Cometa foi observado em indivíduos expostos a pesticidas que demonstraram menor atividade da paraoxonase, i.e., aqueles com genótipo *Gln/Gln* (Singh *et al.*, 2011b). Em fumicultores, não houve associação entre *PON1* e os sintomas/sinais (aspectos neurológicos e de saúde geral, avaliação da atividade das enzimas paraoxonase e colinesterase) de exposição a longo prazo (Sozmen *et al.*, 2007). Em nosso trabalho não observamos associação entre o polimorfismo *PON1*192* e os resultados obtidos pelo ensaio Cometa e pelo teste de MN em linfócitos binucleados. Contudo, aumento significativo na frequência de MN em células basais da mucosa oral foi observado em indivíduos *PON1 Gln/Gln* no grupo exposto a pesticidas. Esta mesma modulação foi percebida em fumicultores avaliados em Santa Cruz do Sul - RS (Alves *et al.*, *in prep*). Talvez organofosforados e carbamatos sejam utilizados em menores quantidades por fumicultores do que por outros agricultores, podendo haver diferença na resposta entre os tipos celulares.

Embora indivíduos homozigotos *Gln/Gln* tenham apresentado níveis menores da atividade da colinesterase em relação a indivíduos *Gln/Arg* ou *Arg/Arg*, esta diferença não foi significativa em nosso estudo. Trabalhadores ocupacionalmente expostos a pesticidas organofosforados não demonstraram correlação entre o polimorfismo *PON1*192* e o nível de colinesterase (Singh *et al.*, 2011b), o mesmo foi observado em fumicultores (Sozmen *et al.*, 2007).

O alelo *CYP2A6*9* está associado com menor disponibilidade de nicotina no sistema (Benowitz *et al.*, 2006) devido ao metabolismo mais lento de nicotina e cumarina (Peamkrasatam *et al.*, 2006). Menores níveis de cotinina são encontrados na urina de indivíduos portando alelo *CYP2A6* inativo (Oscarson, 2001). Apesar de, em nosso estudo, os fumicultores com genótipos *CYP2A6*9/-* apresentarem níveis menores de cotinina no sangue do que indivíduos *CYP2A6*I/*I* no momento da colheita da folha, não houve associação significativa entre a dosagem de cotinina e o polimorfismo *CYP2A6*9*.

Não há pesquisas que demonstrem influência do alelo *CYP2A6*9* no dano ao DNA. Kiyotani *et al.* (2003) sugere que a substituição do nucleotídeo -48T a G na região promotora do gene *CYP2A6*, que resulta no alelo *CYP2A6*9*, diminua a expressão do RNAm. A significância transcricional do polimorfismo *CYP2A6*9*, *in vivo*, é a redução dos níveis da proteína *CYP2A6* em indivíduos que carregam este alelo (Pitarque *et al.*,

2001), tendo atividade enzimática menor do que 50% em relação ao genótipo selvagem (*CYP2A6*1/*1*). Nosso estudo registrou evidência que exposição a nicotina (no momento da colheita) foi associada com maior frequência de alteração cromossômica (frequência de NPB em linfócitos binucleados) em indivíduos com genótipo selvagem *CYP2A6*1/*1* e, por outro lado, aumento da citotoxicidade (frequência de células cariolíticas em mucosa oral) em indivíduos *CYP2A6*9/-*. Podemos supor que durante a colheita, e conseqüente exposição à nicotina, aqueles com genótipo selvagem e, portanto com metabolismo normal, tiveram maior frequência de NPBs. Já aqueles com genótipo associado à capacidade reduzida de metabolização, podem ter apresentado níveis aumentados de nicotina no sistema, induzindo citotoxicidade. Estudos têm demonstrado que indivíduos com o fenótipo *CYP2A6* com atividade reduzida ou inativa têm um risco menor de câncer relacionado à exposição ao tabaco (Ariyoshi *et al.*, 2002; Tamaki *et al.*, 2011), embora resultados conflitantes tenham sido observados (Loriot *et al.*, 2001).

Glutathione S-transferase (GST) é uma família de enzimas representativa da fase II do metabolismo. Polimorfismo dos genes *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1* são estudados em relação à exposição de uma ampla gama de agentes genotóxicos; contudo resultados são inconsistentes e contraditórios (Dhillon *et al.*, 2011). Neste trabalho, polimorfismo do gene *GSTM1 nulo* foi associado com uma variação significativa na frequência de NBUD nos grupos estudados. Maior frequência de NBUD foi visto em indivíduos não expostos com o genótipo *GSTM1 não nulo* enquanto que nos indivíduos expostos no período da aplicação de pesticidas com genótipo *GSTM1 nulo*. Em estudos anteriores envolvendo indivíduos não expostos, o polimorfismo *GSTM1 não nulo* não foi relacionado com aumento da frequência de aberrações cromossômicas, de troca de cromátides irmãs e de MN (Uuskula *et al.*, 1995; Scarpatto *et al.*, 1996). Porém, resultado semelhante ao nosso foram encontrados por Falck *et al.* (1999), Leopardi *et al.* (2003) e Laffon *et al.* (2002), que avaliaram diferentes exposições, e detectaram aumento da frequência de MN no genótipo *GSTM1 não nulo* no grupo não exposto. Polimorfismos de enzimas que metabolizam xenobióticos podem influenciar o nível basal de dano ao cromossomo, se esses participarem do metabolismo inato importante para a integridade cromossômica (Norppa, 2004). Quando um genótipo *nulo* de *GSTM1* é detectado, há uma total ausência da proteína e, por isso, da capacidade de metabolização de alguns carcinógenos ativos, aumentando o risco de dano ao DNA, podendo levar ao desenvolvimento de câncer (Wu *et al.*, 1997). A

falta de *GSTM1* parece estar associada com aumento da sensibilidade à genotoxicidade em fumantes (Norppa, 2004). Jiang *et al.* (2010) e Singh *et al.* (2011a) observaram associação do genótipo *GSTM1* nulo e dano ao DNA, assim como observamos no momento da aplicação de pesticidas. Em um estudo envolvendo viticultores não foi encontrado modulação de *GSTM1* nos resultados de ID, FD e MN (Da Silva *et al.*, 2008). Nós não encontramos nenhuma relação significativa entre os polimorfismos dos genes *GSTT1* e *GSTP1* com dano ao DNA, estando de acordo com outros estudos envolvendo exposição ocupacional a agrotóxicos (Da Silva *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2011a).

A proteína OGG1 catalisa a excisão de purinas oxidadas, incluindo a 8-oxo-7,8-dihidroguanina (8-oxoG) e anéis de purina (Dizdaroglu, 2005). Estudos do efeito da substituição *OGG1Ser326Cys* em algumas populações revelaram que o alelo *Cys* tem menor habilidade de suprimir mutações do que o alelo selvagem (Ito *et al.*, 2002; Yamane *et al.*, 2004; Janik *et al.*, 2011). Em viticultores expostos a pesticidas, baixos níveis de dano ao DNA foram detectados pelo ensaio Cometa naqueles indivíduos contendo o genótipo de reparo ao DNA *OGG1Ser/Ser* quando comparados aos indivíduos com a variante *Cys326*, provavelmente refletindo a baixa atividade da enzima desta variante (Rohr *et al.*, 2011). Nosso estudo não encontrou associação entre o polimorfismo do gene *OGG1* com os resultados obtidos pelo ensaio Cometa e pelo teste de MN.

A proteína XRCC1 tem um papel importante no reparo da via BER, atuando como um *scaffold* coordenando outras proteínas BER, tais como a DNA polimerase β , DNA ligase III, e poli-ADP-ribose polimerase (PARP) (Frosina, 2004). Células do ovário de hamster chinês com a proteína XRCC1 não funcional são hipersensíveis ao dano no DNA induzido por agentes alquilantes, ERO ou por radiação ionizante sugerindo um papel essencial de XRCC1 no reparo (Caldecott, 2003). O polimorfismo *XRCC1Arg194Trp* tem sido sugerido por aumentar a capacidade individual de reparo (revisado em (Frosina, 2004)]. Diversos estudos indicam o efeito protetor do alelo *XRCC1*Trp* contra tumores (Stern *et al.*, 2001; Goode *et al.*, 2002; Hu *et al.*, 2005; Breton *et al.*, 2007). Esse polimorfismo não afetou os bio marcadores avaliados em fumicultores, de acordo com o observado em outros trabalhos envolvendo exposição ocupacional em agricultores (Rohr *et al.*, 2011; Wong *et al.*, 2008).

Quebra na fita dupla é reparada por recombinação homóloga (HR) e por recombinação não-homóloga (NHEJ), sendo o NHEJ a forma de reparo predominante nas

células de mamíferos (Ruttan e Glickman, 2002). Embora polimorfismos genéticos das proteínas envolvendo a HR tenham sido identificados e investigados, pouco se sabe sobre as proteínas envolvendo a NHEJ em termos de variação genética e o impacto potencial de tal variação na capacidade de reparo e consequente risco de carcinogênese (Relton *et al.*, 2004). Evidências sugerem que alteração genética nas proteínas da via NHEJ pode influenciar diretamente a capacidade de reparo. Diferentes polimorfismos no gene *XRCC4* têm sido registrados (Ford *et al.*, 2000). Um deles, o polimorfismo *XRCC4 Ile→Thr* no códon 401 foi avaliado em nosso trabalho. Entre indivíduos expostos, aqueles que apresentaram o alelo *XRCC4*Thr* tiveram maior frequência de MN, indicando uma menor atividade do alelo variante (*Thr*) em viticultores (Rohr, 2008). Células deficientes de *XRCC4* apresentaram maior quantidade de aberrações cromossômicas após a exposição à radiação ionizante, demonstrando incapacidade de reparo de quebras de fita dupla (Katsube *et al.*, 2011). No presente trabalho, nenhuma associação foi encontrada entre os resultados de ensaio Cometa e teste de MN com os genótipos do gene *XRCC4* nos grupos expostos. Já o grupo não exposto apresentou associação entre o genótipo *XRCC4 Ile/Ile* e o aumento da frequência de NPB.

O gene *RAD51* está envolvido na via de HR. O polimorfismo *Rad51*G135C* está localizado na região 5'UTR do gene, podendo afetar a instabilidade do RNAm ou a eficiência de translocação para o citoplasma, bem como levar a alterações nos níveis ou na função da proteína (Poplawski *et al.*, 2006). Krupa *et al.* (2011) sugere que o polimorfismo *135G>C* do gene *RAD51* pode estar associado a câncer endometrial. Apesar disto, nossos resultados não encontram associação entre os resultados do ensaio Cometa e do teste de MNs com o polimorfismo de gene *RAD51* para os grupos expostos, assim como Rohr (2008) que avaliou exposição ocupacional em viticultores. Enquanto que para o grupo não exposto, foi encontrada associação entre os genótipos *RAD51 C/C* ou *G/C* e o aumento da frequência de MN.

Diferença na modulação por determinado genótipo no grupo exposto que não é percebida no grupo não exposto sugere efeito exposição-específica. Enquanto que efeito do genótipo (visto no mesmo nível) em ambos os grupos, exposto e não exposto, provavelmente represente efeito no nível basal do biomarcador (Norppa, 2004). Assim, as diferenças encontradas entre alguns genótipos dos genes de reparo do grupo não expostos, possam ser explicadas por estas variantes influenciarem a capacidade individual de reparo

ao DNA e por interagir com fatores de estilo de vida em indivíduos não expostos. Estilo de vida determina os níveis de exposição à mutágenos/carcinógenos ambientais em populações saudáveis não expostas a fatores ocupacionais (Weng *et al.*, 2008). Polimorfismos afetando processos celulares fundamentais responsáveis pela manutenção da integridade genômica, tal como o reparo ao DNA, pode ser esperado por ter este efeito (Norppa, 2004).

Nossa investigação chama a atenção ao significativo aumento do dano ao DNA em todos os períodos da safra de fumo identificados aqui, demonstrando que os indivíduos avaliados sofrem exposição ocupacional crônica e necessitam constante proteção. Deve-se atenção especial ao momento da colheita, onde estresse oxidativo e dano ao DNA foram encontrados em maiores níveis e onde os fumicultores têm menos cuidado individual. Nossos resultados estão de acordo com o observado por Shadnia *et al.* (2005), onde agricultores sofrendo exposição crônica demonstraram aumento nos níveis de enzimas antioxidantes e de peroxidação lipídica na ausência de inibição da atividade da colinesterase. Fraca modulação foi percebida em relação aos genes de metabolização/reparo com os resultados obtidos nos diferentes biomarcadores. Assim, realizar avaliações que permitam predizer possíveis riscos sobre exposições ocupacionais é atualmente um assunto considerado de extrema urgência (Bolognesi, 2003; Hernandez *et al.*, 2005). Estudos de biomonitoramento realizados a partir de testes genotóxicos e mutagênicos são valiosas ferramentas de avaliação e controle sobre danos genéticos, exercidos por misturas complexas de produtos químicos. Devido à ocorrência de significativos efeitos severos a saúde demonstrados em estudos epidemiológicos realizados entre agricultores, fica comprovado que a exposição ocupacional contribui para a maior incidência de lesões no DNA em células somáticas, reconhecidamente um evento crítico na gênese do câncer e doenças hereditárias. Além disso, estudos de biomonitoramento ocupacional permitem estabelecer limites de tolerância, para que a exposição aos agrotóxicos e sua manipulação ocorra de forma adequada, objetivando diminuir a incidência de efeitos sobre o bem estar físico e mental dos indivíduos ocupacionalmente expostos.

V.2 CONCLUSÕES

O presente trabalho permitiu concluir que a exposição a múltiplos pesticidas (incluindo a nicotina) utilizados na fumicultura é responsável por efeitos genotóxicos e mutagênicos entre indivíduos expostos. Além disto,

- ✓ o ensaio Cometa realizado em sangue periférico permitiu verificar os efeitos genotóxicos da exposição ocupacional a mistura complexa de compostos em todos os momentos da safra avaliados neste trabalho;
- ✓ efeito clastogênico e/ou aneugênico, alterações cromossômicas e possível amplificação gênica foram observados no grupo exposto devido a maior incidência de micronúcleos, células com ponte e broto nuclear nos linfócitos binucleados nos fumicultores;
- ✓ as avaliações morfológicas das células da mucosa oral demonstraram aumentos nos eventos de morte celular (cromatina condensada, cariorrética, cariolítica, picnótica). Maior incidência de células basais nos indivíduos expostos representa o aumento da capacidade proliferativa. Além disto, aumento de células binucleadas, aumento na frequência de MN e de broto nuclear refletem falhas na citocinese, efeito clastogênico e/ou aneugênico e possível amplificação gênica;
- ✓ a análise do hematócrito e da atividade de colinesterase sérica não demonstrou diferenças significativas entre os grupos;
- ✓ a dosagem de cotinina demonstrou níveis significativamente maior entre o momento da colheita em relação ao grupo não exposto e o momento da entressafra;
- ✓ a análise dos dados quanto aos diferentes parâmetros de gênero, idade, tempo de exposição e uso de EPI, demonstrou que somente a idade e o uso de EPI foram fatores de influência nos resultados obtido pelo teste de MN nos indivíduos expostos a pesticidas;
- ✓ diferença no conteúdo de elementos traço foi encontrada no sangue total de fumicultores no momento da aplicação de pesticidas em relação ao grupo não exposto e ao momento da colheita. Níveis maiores de cromo, magnésio, alumínio, cloro, zinco e potássio foram encontrados;

- ✓ aumento significativo na frequência de MN em células basais de mucosa oral foi observado em indivíduos *PON1 Gln/Gln* no grupo exposto a pesticidas, porém não foi observado o mesmo em relação a frequência de MN em linfócito;
- ✓ nosso estudo registrou evidência que exposição a nicotina (no momento da colheita) foi associada com maior frequência de alteração cromossômica (frequência de NPB) em indivíduos com genótipo selvagem *CYP2A6*1/*1* e citotoxicidade aumentada (frequência de células cariolíticas) em indivíduos *CYP2A6*9/-*;
- ✓ polimorfismo do gene *GSTM1* foi associado com uma variação significativa na frequência de NBUD em indivíduos não expostos e nos indivíduos no momento da aplicação de pesticidas; nenhuma relação significativa entre os polimorfismos dos genes *GSTT1* e *GSTP1* com dano ao DNA foi encontrada;
- ✓ Os polimorfismos *OGG1Ser326Cys*, *XRCC1Arg194Trp*, *Rad51G135C*, *XRCC4Ile401Thr* individualmente parecem não influenciar os biomarcadores de exposição e efeito analisados nos indivíduos expostos;
- ✓ Os polimorfismos *Rad51G135C* e *XRCC4Ile401Thr*, na análise individual, parecem modular os danos detectados no teste de MN, para exposição de uma maneira geral, ou seja, nos indivíduos não expostos;
- ✓ estresse oxidativo foi observado nos indivíduos expostos em relação aos não expostos;
- ✓ estresse oxidativo e dano ao DNA em linfócitos binucleados foi maior no momento da colheita da folha de fumo em relação ao momento da aplicação de pesticidas.

CAPÍTULO VI

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdollahi M, Ranjbar A, Shadnia S, Nikfar S and Rezaie A (2004) Pesticides and oxidative stress: a review. *Med Sci Monit* 10: 141-147.
- Abu Mourad T (2005) Adverse impact of insecticides on the health of Palestinian farm workers in the Gaza Strip: a hematologic biomarker study. *Int J Occup Environ Health* 11: 144-149.
- Adamu CA, Bell PF, Mulchi C and Chaney R (1989) Residual metal concentrations in soils and leaf accumulations in tobacco a decade following farmland application of municipal sludge. *Environ Pollut* 56: 113-126.
- Adler ID and Attia SM (2003) Nicotine is not clastogenic at doses of 1 or 2 mg/kg body weight given orally to male mice. *Mutat Res* 542: 139-142.
- AFUBRA Associação dos fumicultores do Brasil. <http://www.afubra.com.br> (setembro, 2011)
- Agbon AO, Omoniyi II and Teko AA (2002) Acute toxicity of tobacco (*Nicotiana tabacum*) leaf dust on *Oreochromis niloticus* and haematological changes resulting from sublethal exposure. *Journal of Aquatic Science* 17: 5-8.
- Agostinetto D, Puchalski LEA, Azevedo R, Storch G, Bezerra AJA and Grützmacher AD (2000) Caracterização da Fumicultura no Município de Pelotas-RS. *Revista Brasileira de Agrociências* 6: 171-175.
- AGROFIT Sistema de Agrotóxicos Fitossanitário. http://extranetagriculturagovbr/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. (agosto, 2011)
- Akinpelu DA and Obuotor EM (2000) Antibacterial activity of *Nicotiana tabacum* leaves. *Fitoterapia* 71: 199-200.
- Ali T, Bhalli JA, Rana SM and Khan QM (2008) Cytogenetic damage in female Pakistani agricultural workers exposed to pesticides. *Environ Mol Mutagen* 49: 374-380.
- Almeida GEG (2005) Fumo: servidão moderna e violação de direitos humanos. Curitiba: Terra de Direitos:168.
- Alves J, Silva FR, Salvador M, Kvitko K, Rohr P, Henriques JAP and da Silva J (*in preparation*) Occupational Exposure and Evaluation of genotoxicity in tobacco farmers.
- Andersen RA and Kemp TR (1985) Accumulation of 4-(N-methyl-N-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in alkaloid genotypes of burley tobacco during postharvest processing: comparisons with N'-nitrosonornicotine and probable nitrosamine precursors. *Cancer Res* 45: 5287-5293.
- Andrade VM, Silva J, Silva FR, Heuser VD, Dias JF, Yoneama ML and Freitas TR (2004) Fish as bioindicators to assess the effects of pollution in two southern Brazilian rivers using the Comet assay and micronucleus test. *Environ Mol Mutagen* 44: 459-468.
- Araújo AJ, Lima JSD, Moreira JC, Jacob SDC, Soares MDO, Monteiro MCM, Amaral AMD, Kubota A, Meyer A, Cosenza CAN, Neves CD and Markowitz S (2007) Exposição múltipla a agrotóxicos e efeitos à saúde: estudo transversal m amostra de 102 trabalhadores rurais. *Ciência & Saúde Coletiva* 12: 115-130.

- Arcury TA, Quandt SA, Preisser JS, Bernert JT, Norton D and Wang J (2003) High levels of transdermal nicotine exposure produce green tobacco sickness in Latino farmworkers. *Nicotine Tob Res* 5: 315-321.
- Arcury TA, Vallejos QM, Schulz MR, Feldman SR, Fleischer AB, Jr., Verma A and Quandt SA (2008) Green tobacco sickness and skin integrity among migrant Latino farmworkers. *Am J Ind Med* 51: 195-203.
- Ariyoshi N, Miyamoto M, Umetsu Y, Kunitoh H, Dosaka-Akita H and Sawamura Y (2002) Genetic polymorphism of *CYP2A6* gene and tobacco induced lung cancer risk in male smokers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11: 890-894.
- Arnal N, Astiz M, de Alaniz MJ and Marra CA (2011) Clinical parameters and biomarkers of oxidative stress in agricultural workers who applied copper-based pesticides. *Ecotoxicol Environ Saf* 74: 1779-1786.
- Attia SM (2007a) Chromosomal composition of micronuclei in mouse bone marrow treated with rifampicin and nicotine, analyzed by multicolor fluorescence in situ hybridization with pancentromeric DNA probe. *Toxicology* 235: 112-118.
- Attia SM (2007b) The genotoxic and cytotoxic effects of nicotine in the mouse bone marrow. *Mutat Res* 632: 29-36.
- Au WW, Salama SA and Sierra-Torres CH (2003) Functional characterization of polymorphisms in DNA repair genes using cytogenetic challenge assays. *Environ Health Perspect* 111: 1843-1850.
- Ballard T, Ehlers J, Freund E, Auslander M, Brandt V and Halperin W (1995) Green tobacco sickness: occupational nicotine poisoning in tobacco workers. *Arch Environ Health* 50: 384-389.
- Banerjee BD, Seth V, Bhattacharya A, Pasha ST and Chakraborty AK (1999) Biochemical effects of some pesticides on lipid peroxidation and free-radical scavengers. *Toxicol Lett* 107: 33-47.
- Battershill JM, Burnett K and Bull S (2008) Factors affecting the incidence of genotoxicity biomarkers in peripheral blood lymphocytes: impact on design of biomonitoring studies. *Mutagenesis* 23: 423-437.
- Benowitz NL, Swan GE, Jacob P, Lessov-Schlaggar CN and Tyndale RF (2006) *CYP2A6* genotype and the metabolism and disposition kinetics of nicotine. *Clin Pharmacol Ther* 80: 457-467.
- Bishun NP, Lloyd N, Raven RW and Williams DC (1972) The *in vitro* and *in vivo* cytogenetic effects of nicotine. *Acta Biol Acad Sci Hung* 23: 175-180.
- Bittencourt B (2007) Crianças trabalhando no fumo se tornam adultos precoces. In: <http://www.wbbccouk/portuguese/noticias/story>.
- Blair A and Freeman LB (2009) Epidemiologic studies in agricultural populations: observations and future directions. *J Agromedicine* 14: 125-131.
- Blecher B (1996) Suicídios Apavoram as Cidades do Fumo. In: *Folha de São Paulo*. Novembro: São Paulo.
- 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.

- Breton CV, Zhou W, Kile ML, Houseman EA, Quamruzzaman Q, Rahman M, Mahiuddin G and Christiani DC (2007) Susceptibility to arsenic-induced skin lesions from polymorphisms in base excision repair genes. *Carcinogenesis* 28: 1520-1525.
- Bull S, Fletcher K, Boobis AR and Battershill JM (2006) Evidence for genotoxicity of pesticides in pesticide applicators: a review. *Mutagenesis* 21: 93-103.
- Butterworth FM (1995) Introduction to biomonitors and biomarkers as indicators of environmental change. In: *Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change*. Butterworth BE, Corkum LD, Guzmán-Rincón J (eds): Plenum Press, New York. pp 1-8.
- Caldecott KW (2003) *XRCC1* and DNA strand break repair. *DNA Repair (Amst)* 2: 955-969.
- Carvalho NL e Pivoto TS (2011) Ecotoxicologia: conceitos, abrangência e importância agrônômica. *Monografias Ambientais* 2: 176-192.
- Cassee FR, Groten JP, van Bladeren PJ and Feron VJ (1998) Toxicological evaluation and risk assessment of chemical mixtures. *Crit Rev Toxicol* 28: 73-101.
- Cavalcante DG, Martinez CB and Sofia SH (2008) Genotoxic effects of Roundup on the fish *Prochilodus lineatus*. *Mutat Res* 655: 41-46.
- Coskun M, Cayir A and Ozdemir O (2011) Frequencies of micronuclei (MNi), nucleoplasmic bridges (NPBs), and nuclear buds (NBUDs) in farmers exposed to pesticides in Canakkale, Turkey. *Environ Int* 37: 93-96.
- Costa C, Teixeira JP, Silva S, Roma-Torres J, Coelho P, Gaspar J, Alves M, Laffon B, Rueff J and Mayan O (2006) Cytogenetic and molecular biomonitoring of a Portuguese population exposed to pesticides. *Mutagenesis* 21: 343-350.
- Costa RM e Menck CF (2004) Genes de Reparo de DNA. In: *Oncologia Molecular*. Ferreira CG, Rocha JC (eds). Ed. Atheneu: São Paulo. pp 43-55.
- Cruvinel PE, Flocchini RG, Artaxo P, Crestana S and Herrmann PSP (1999) Elemental analysis of agricultural soil samples by particle induced X-ray emission (PIXE) technique. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B* 150: 478-483.
- Curwin BD, Hein MJ, Sanderson WT, Nishioka M and Buhler W (2003) Acephate exposure and decontamination on tobacco harvesters' hands. *J Expo Anal Environ Epidemiol* 13: 203-210.
- Curwin BD, Hein MJ, Sanderson WT, Nishioka MG and Buhler W (2005) Nicotine exposure and decontamination on tobacco harvesters' hands. *Ann Occup Hyg* 49: 407-413.
- Da Silva FR, Da Silva J, Dalpiaz T, Nunes E, Ferraz A, Martins TLC, Dias JF, da Rosa DP, Porawski M, Bona S and Erdtmann B (*in preparation*) Genotoxicity effect of *Nicotiana tabacum* leaves on *Helix aspersa*.
- Da Silva FR, Erdtmann B, Dalpiaz T, Nunes E, Da Rosa DP, Porawski M, Bona S, Simon CF, Da CAM and Da Silva J (2010b) Effects of dermal exposure to *Nicotiana tabacum* (Jean Nicot, 1560) leaves in mouse evaluated by multiple methods and tissues. *J Agric Food Chem* 58: 9868-9874.
- Da Silva J, Freitas TRO, Marinho JR, Speit G and Erdtmann B (2000) An Alkaline single-cell gel electrophoresis (comet) assay for environmental biomonitoring with native rodents. *Genetics and Molecular Biology* 23: 241-245.
- Da Silva J, Moraes CR, Heuser VD, Andrade VM, Silva FR, Kvitko K, Emmel V, Rohr P, Bordin DL, Andrezza AC, Salvador M, Henriques JA and Erdtmann B (2008) Evaluation of genetic damage in a Brazilian population occupationally exposed to

- pesticides and its correlation with polymorphisms in metabolizing genes. *Mutagenesis* 23: 415-422.
- De Flora S, Znacchi P, Camoirano A, Bennicelli C and Badolati GS (1984) Genotoxic activity and potency of 135 compounds in the Ames reversion test and in a bacterial DNA-repair test. *Mutat Res* 133: 161-198.
- De Ruyck K, Van Eijkeren M, Claes K, Morthier R, De Paepe A, Vral A, De Ridder L and Thierens H (2005) Radiation-induced damage to normal tissues after radiotherapy in patients treated for gynecologic tumors: association with single nucleotide polymorphisms in *XRCC1*, *XRCC3*, and *OGG1* genes and in vitro chromosomal radiosensitivity in lymphocytes. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 62: 1140-1149.
- Deser (2003) Fumo: empresas pagam o que querem aos agricultores. *Boletim Deser* 17.
- Dhillon VS, Thomas P and Fenech M (2004) Comparison of DNA damage and repair following radiation challenge in buccal cells and lymphocytes using single-cell gel electrophoresis. *Int J Radiat Biol* 80: 517-528.
- Dhillon VS, Thomas P, Iarmarcovai G, Kirsch-Volders M, Bonassi S and Fenech M (2011) Genetic polymorphisms of genes involved in DNA repair and metabolism influence micronucleus frequencies in human peripheral blood lymphocytes. *Mutagenesis* 26: 33-42.
- Dizdaroglu M (2005) Base-excision repair of oxidative DNA damage by DNA glycosylases. *Mutat Res* 591: 45-59.
- Domico LM, Cooper KR, Bernard LP and Zeevalk GD (2007) Reactive oxygen species generation by the ethylene-bis-dithiocarbamate (EBDC) fungicide mancozeb and its contribution to neuronal toxicity in mesencephalic cells. *Neurotoxicology* 28: 1079-1091.
- Domingues MR, Rodrigues MB, Sataque EY e Ono MA (2004) Agrotóxicos: Risco à Saúde do Trabalhador Rural. *Ciências Biológicas e da Saúde* 25: 45-54.
- Doolittle DJ, Winegar R, Lee CK, Caldwell WS, Hayes AW and de Bethizy JD (1995) The genotoxic potential of nicotine and its major metabolites. *Mutat Res* 344: 95-102.
- Dulout FN, Pastori MC, Olivero OA, Gonzalez Cid M, Loria D, Matos E, Sobel N, de Bujan EC and Albiano N (1985) Sister-chromatid exchanges and chromosomal aberrations in a population exposed to pesticides. *Mutat Res* 143: 237-244.
- Dusinska M and Collins AR (2008) The comet assay in human biomonitoring: gene-environment interactions. *Mutagenesis* 23: 191-205.
- Efferth T and Volm M (2005) Pharmacogenetics for individualized cancer chemotherapy. *Pharmacol Ther* 107: 155-176.
- Etges VE, Ferreira M, Camargo ME, Torres JP, Trapé AZ, Botega N, Alcayaga EAL, Ferrão M, Benvegnu L, Lima RG, Collischon E, Rathke F, Hermes N, Carbonari SJ, Fialho RR, Friedrich M, Alves EB, Rehbein M e Brentano D (2002) O impacto da cultura do tabaco no ecossistema e na saúde humana. *Textual, Porto Alegre* 1: 14-21.
- Falck GC, Hirvonen A, Scarpato R, Saarikoski ST, Migliore L and Norppa H (1999) Micronuclei in blood lymphocytes and genetic polymorphism for *GSTM1*, *GSTT1* and *NAT2* in pesticide-exposed greenhouse workers. *Mutat Res* 441: 225-237.
- Falk JW, Carvalho LA, Silva LR e Pinheiro S (1996) Suicídio e doença mental em Venâncio Aires - RS: consequência do uso de agrotóxicos organofosforados? In: *Relatório Preliminar de Pesquisa*.
- Faria NMX, Fassa AG e Facchini 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.

- Fenech M (2006) Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a "cytome" assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. *Mutat Res* 600: 58-66.
- Fenech M and Bonassi S (2011) The effect of age, gender, diet and lifestyle on DNA damage measured using micronucleus frequency in human peripheral blood lymphocytes. *Mutagenesis* 26: 43-49.
- Fenech M, Kirsch-Volders M, Natarajan AT, Surralles J, Crott JW, Parry J, Norppa H, Eastmond DA, Tucker JD and Thomas P (2011) Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis* 26: 125-132.
- Ford BN, Ruttan CC, Kyle VL, Brackley ME and Glickman BW (2000) Identification of single nucleotide polymorphisms in human DNA repair genes. *Carcinogenesis* 21: 1977-1981.
- Frosina G (2004) Commentary: DNA base excision repair defects in human pathologies. *Free Radic Res* 38: 1037-1054.
- Gallo D, Nakano O, Neto SS, Carvalho RPL, Baptista GC, Filho EB, Parra JRP, Zucchi RA, Alves SB, Vendramim JD, Marchini LC, Lopes JRS e Omoto C (2002) *Entomologia agrícola*. São Paulo: EdLuiz de Queiroz (USP).
- Garaj-Vrhovac V and Zeljezic D (2001) Cytogenetic monitoring of croatian population occupationally exposed to a complex mixture of pesticides. *Toxicology* 165: 153-162.
- Garcia EG e Alves Filho JP (2005) Aspectos de prevenção e controle de acidentes no trabalho com agrotóxicos. São Paulo: Fundacentro.
- Gehlbach (1975) Nicotine absorption by workers harvesting green tobacco. *Lancet* 1: 478-480.
- Glantz S, Siade J, Bero L, Hanauer P and Barners D (1996) *The cigarette papers*. Berkeley and Los Angeles: University of California Press.
- Golia EE, Dimirkou A and Mitsios IK (2007) Accumulation of metals on tobacco leaves (primings) grown in an agricultural area in relation to soil. *Bull Environ Contam Toxicol* 79: 158-162.
- Goode EL, Ulrich CM and Potter JD (2002) Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11: 1513-1530.
- Groten JP, Feron VJ and Suhnel J (2001) Toxicology of simple and complex mixtures. *Trends Pharmacol Sci* 22: 316-322.
- Grover P, Danadevi K, Mahboob M, Rozati R, Banu BS and Rahman MF (2003) Evaluation of genetic damage in workers employed in pesticide production utilizing the Comet assay. *Mutagenesis* 18: 201-205.
- Guecheva TN e Henriques JAP (2003) Reparação de DNA em células Eucarióticas. In: *Genética Toxicológica*. Silva J, Erdtmann B, Henriques JPA (eds). Ed. Alcance: Porto Alegre. pp 225-247.
- Guilherme S, Gaivao I, Santos MA and Pacheco M (2010) European eel (*Anguilla anguilla*) genotoxic and pro-oxidant responses following short-term exposure to Roundup--a glyphosate-based herbicide. *Mutagenesis* 25: 523-530.
- Guy RH and Hadgraft J (1989) Mathematical models of percutaneous absorption. In: *Percutaneous absorption: mechanisms - methodology - drug delivery*. Bronaugh RL, Maibach HI (eds). Marcel Dekker: New York.
- Hansen R, Saebo M, Skjelbred CF, Nexø BA, Hagen PC, Bock G, Bowitz Lothe IM, Johnson E, Aase S, Hansteen IL, Vogel U and Kure EH (2005) *GPX Pro198Leu* and

- OGG1 Ser326Cys* polymorphisms and risk of development of colorectal adenomas and colorectal cancer. *Cancer Lett* 229: 85-91.
- Hao B, Wang H, Zhou K, Li Y, Chen X, Zhou G, Zhu Y, Miao X, Tan W, Wei Q, Lin D and He F (2004) Identification of genetic variants in base excision repair pathway and their associations with risk of esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 64: 4378-4384.
- Hecht SS and Hoffmann D (1988) Tobacco-specific nitrosamines, an important group of carcinogens in tobacco and tobacco smoke. *Carcinogenesis* 9: 875-884.
- Heddle JA, Cimino MC, Hayashi M, Romagna F, Shelby MD, Tucker JD, Vanparys P and MacGregor JT (1991) Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present, and future. *Environ Mol Mutagen* 18: 277-291.
- Hernandez A, Xamena N, Gutierrez S, Velazquez A, Creus A, Surralles J, Galofre P and Marcos R (2006) Basal and induced micronucleus frequencies in human lymphocytes with different *GST* and *NAT2* genetic backgrounds. *Mutat Res* 606: 12-20.
- Hernandez AF, Lopez O, Rodrigo L, Gil F, Pena G, Serrano JL, Parron T, Alvarez JC, Lorente JA and Pla A (2005) Changes in erythrocyte enzymes in humans long-term exposed to pesticides: influence of several markers of individual susceptibility. *Toxicol Lett* 159: 13-21.
- Herrero-Hernandez E, Andrades MS, Rodriguez-Cruz MS, Arienzo M and Sanchez-Martin MJ (2011) Long-term variability of metals from fungicides applied in amended young vineyard fields of La Rioja (Spain). *Environ Monit Assess*.
- Heuser VD, da Silva J, Moriske HJ, Dias JF, Yoneama ML and de Freitas TR (2002) Genotoxicity biomonitoring in regions exposed to vehicle emissions using the comet assay and the micronucleus test in native rodent *Ctenomys minutus*. *Environ Mol Mutagen* 40: 227-235.
- Hinds JID (1882) The Use of Tobacco. Cumberland Presbyterian Publishing House,. In: <http://medicolegaltripod.com/hinds1882htm>. Cumberland Presbyterian Publishing House. pp 1-138.
- Hu Z, Ma H, Chen F, Wei Q and Shen H (2005) *XRCC1* polymorphisms and cancer risk: a meta-analysis of 38 case-control studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14: 1810-1818.
- Humbert R, Adler DA, Disteché CM, Hassett C, Omiecinski CJ and Furlong CE (1993) The molecular basis of the human serum paraoxonase activity polymorphism. *Nat Genet* 3: 73-76.
- Iarmarcovai G, Bonassi S, Botta A, Baan RA and Orsiere T (2008) Genetic polymorphisms and micronucleus formation: a review of the literature. *Mutat Res* 658: 215-233.
- IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. <http://www.ibge.gov.br/home/> (setembro, 2011)
- INCA Instituto Nacional do Câncer. <http://www2.incagov.br/wps/wcm/connect/inca/portal/home>. (setembro, 2011)
- IPCS IPoCS (2004) Assessment of Combined Exposures. <http://www.who.int/ipcs/methods/harmonization/areas/aggregate/en/indexhtml>
- Ito H, Hamajima N, Takezaki T, Matsuo K, Tajima K, Hatooka S, Mitsudomi T, Suyama M, Sato S and Ueda R (2002) A limited association of *OGG1 Ser326Cys* polymorphism for adenocarcinoma of the lung. *J Epidemiol* 12: 258-265.
- Janik J, Swoboda M, Janowska B, Cieśla JM, Gackowski D, Kowalewski J, Olinski R, Tudek B and Speina E (2011) 8-Oxoguanine incision activity is impaired in lung

- tissues of NSCLC patients with the polymorphism of *OGG1* and *XRCC1* genes. *Mutat Res*.
- Jakubowski M and Trzcinka-Ochocka M (2005) Biological monitoring of exposure: trends and key developments. *J Occup Health* 47: 22-48.
- Jawad M, Seedhouse CH, Russell N and Plumb M (2006) Polymorphisms in human homeobox *HLX1* and DNA repair *RAD51* genes increase the risk of therapy-related acute myeloid leukemia. *Blood* 108: 3916-3918.
- Jiang S, Yu L, Cheng J, Leng S, Dai Y, Zhang Y, Niu Y, Yan H, Qu W, Zhang C, Zhang K, Yang R, Zhou L and Zheng Y (2010) Genomic damages in peripheral blood lymphocytes and association with polymorphisms of three glutathione S-transferases in workers exposed to formaldehyde. *Mutat Res* 695: 9-15.
- Joksic G, Vidakovic A and Spasojevic-Tisma V (1997) Cytogenetic monitoring of pesticide sprayers. *Environ Res* 75: 113-118.
- Kang SW, Park HJ, Ban JY, Chung JH, Chun GS and Cho JO (2011) Effects of nicotine on apoptosis in human gingival fibroblasts. *Arch Oral Biol*.
- Katsube T, Mori M, Tsuji H, Shiomi T, Shiomi N and Onoda M (2011) Differences in Sensitivity to DNA-damaging Agents between *XRCC4*- and Artemis-deficient Human Cells. *J Radiat Res (Tokyo)* 52: 415-424.
- Khan DA, Bhatti MM, Khan FA, Naqvi ST and Karam A (2008) Adverse effects of pesticides residues on biochemical markers in pakistani tobacco farmers. *Int J Clin Exp Med* 1: 274-282.
- Khan DA, Shabbir S, Majid M, Ahad K, Naqvi TA and Khan FA (2010) Risk assessment of pesticide exposure on health of Pakistani tobacco farmers. *J Expo Sci Environ Epidemiol* 20: 196-204.
- Kiyotani K, Yamazaki H, Fujieda M, Iwano S, Matsumura K, Satarug S, Ujjin P, Shimada T, Guengerich FP, Parkinson A, Honda G, Nakagawa K, Ishizaki T and Kamataki T (2003) Decreased coumarin 7-hydroxylase activities and *CYP2A6* expression levels in humans caused by genetic polymorphism in *CYP2A6* promoter region (*CYP2A6*9*). *Pharmacogenetics* 13: 689-695.
- Kleinsasser NH, Sassen AW, Semmler MP, Harreus UA, Licht AK and Richter E (2005) The tobacco alkaloid nicotine demonstrates genotoxicity in human tonsillar tissue and lymphocytes. *Toxicol Sci* 86: 309-317.
- Kohno T, Shinmura K, Tosaka M, Tani M, Kim SR, Sugimura H, Nohmi T, Kasai H and Yokota J (1998) Genetic polymorphisms and alternative splicing of the *hOGG1* gene, that is involved in the repair of 8-hydroxyguanine in damaged DNA. *Oncogene* 16: 3219-3225.
- Komarek M, Cadkova E, Chrastny V, Bordas F and Bollinger JC (2010) Contamination of vineyard soils with fungicides: a review of environmental and toxicological aspects. *Environ Int* 36: 138-151.
- Krupa R, Sobczuk A, Poplawski T, Wozniak K and Blasiak J (2011) DNA damage and repair in endometrial cancer in correlation with the *hOGG1* and *RAD51* genes polymorphism. *Mol Biol Rep* 38: 1163-1170.
- Kvitko K (2003) A Carcinogênese e seus Agentes. In: *Genética Toxicológica*. Da Silva J, Erdtmann B, Henriques JAP (eds). Editora Alcance: Porto Alegre. pp 323-339.
- Laffon B, Pasaro E and Mendez J (2002) Evaluation of genotoxic effects in a group of workers exposed to low levels of styrene. *Toxicology* 171:175-186.
- Lal A and Ames BN (2011) Association of chromosome damage detected as micronuclei with hematological diseases and micronutrient status. *Mutagenesis* 26: 57-62.

- Lander F and Ronne M (1995) Frequency of sister chromatid exchange and hematological effects in pesticide-exposed greenhouse sprayers. *Scand J Work Environ Health* 21: 283-288.
- Larini L (1999) *Toxicologia dos agrotóxicos*. São Paulo: Manole.
- Loriot MA, Rebuissou S, Oscarson M, Cenée S, Miyamoto M and Ariyoshi N (2001) Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2A6 in a case-control study on lung cancer in a French population. *Pharmacogenetics* 11: 39-44.
- Lebailly P, Bouchart V, Baldi I, Lecluse Y, Heutte N, Gislard A and Malas JP (2009) Exposure to pesticides in open-field farming in France. *Ann Occup Hyg* 53: 69-81.
- Leete E (1983) Biosynthesis and metabolism of the tobacco alkaloids. In: *Alkaloids Chemical and Biological Perspectives*. Pelletier SW (ed). John Wiley and Sons: New York. pp 96-139.
- Leopardi P, Zijno A, Marcon F, Conti L, Carere A, Verdina A, Galati R, Tomei F, Baccolo TP and Crebelli R (2003) Analysis of micronuclei in peripheral blood lymphocytes of traffic wardens: effects of exposure, metabolic genotypes, and inhibition of excision repair *in vitro* by ARA-C. *Environ Mol Mutagen* 41: 126-130.
- Li AP and Long TJ (1988) An evaluation of the genotoxic potential of glyphosate. *Fundam Appl Toxicol* 10: 537-546.
- Lodovici M, Casalini C, Briani C and Dolara P (1997) Oxidative liver DNA damage in rats treated with pesticide mixtures. *Toxicology* 117: 55-60.
- Lu JL (2009) Comparison of pesticide exposure and physical examination, neurological assessment, and laboratory findings between full-time and part-time vegetable farmers in the Philippines. *Environ Health Prev Med*.
- Lunn RM, Langlois RG, Hsieh LL, Thompson CL and Bell DA (1999) *XRCC1* polymorphisms: effects on aflatoxin B1-DNA adducts and glycophorin A variant frequency. *Cancer Res* 59: 2557-2561.
- Mally A and Chipman JK (2002) Non-genotoxic carcinogens: early effects on gap junctions, cell proliferation and apoptosis in the rat. *Toxicology* 180: 233-248.
- Maluf SW e Erdtmann B (2003) Biomonitoramento do Dano Genético em Humanos. In: *Genética Toxicológica*. Da Silva J, Erdtmann B, Henriques JAP (eds). Editora Alcançe: Porto Alegre. pp 307-321.
- Maroni M, Colosio C, Ferioli A and Fait A (2000) Biological Monitoring of Pesticide Exposure: a review. Introduction. *Toxicology* 143: 1-118.
- Mateuca RA, Roelants M, Iarmarcovai G, Aka PV, Godderis L, Tremp A, Bonassi S, Fenech M, Berge-LeFranc JL and Kirsch-Volders M (2008) *hOGG1*(326), *XRCC1*(399) and *XRCC3*(241) polymorphisms influence micronucleus frequencies in human lymphocytes *in vivo*. *Mutagenesis* 23: 35-41.
- Mauro MYC (1991) Riscos ocupacionais em saúde. *Revisata de Enfermagem Científica* 3:23-28.
- Mauro MYC, Muzi CD, Guimarães RM and Mauro CCC (2004) Riscos ocupacionais em saúde. *Revista de Enfermagem UERJ* 12: 338-345.
- McBride JS, Altman DG, Klein M and White W (1998) Green tobacco sickness. *Tob Control* 7: 294-298.
- Ministério da Saúde Legislação - Portarias Técnicas. http://portalsaude.gov.br/portal/saude/areacfm?id_area=169 (agosto, 2011)
- Mireles A, Solís C, Andrade E, Lagunas-Solar M, Piña C and Flocchini RG (2004) Heavy metal accumulation in plants and soil irrigated with wastewater from Mexico city. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B*: 219-220.

- Misery L (2004) Nicotine effects on skin: are they positive or negative? *Exp Dermatol* 13: 665-670.
- Mladinic M, Berend S, Vrdoljak AL, Kopjar N, Radic B and Zeljezic D (2009) Evaluation of genome damage and its relation to oxidative stress induced by glyphosate in human lymphocytes *in vitro*. *Environ Mol Mutagen* 50: 800-807.
- Moreira JC, Jacob SC e Peres F (2002) Avaliação integrada do impacto do uso de agrotóxicos sobre a saúde humana em uma comunidade agrícola de Nova Friburgo. *Ciência & Saúde Coletiva* 7: 299-311.
- Muniz JF, McCauley L, Scherer J, Lasarev M, Koshy M, Kow YW, Nazar-Stewart V and Kisby GE (2008) Biomarkers of oxidative stress and DNA damage in agricultural workers: a pilot study. *Toxicol Appl Pharmacol* 227: 97-107.
- Munzner R and Renner HW (1989) Genotoxic investigations of tobacco protein using microbial and mammalian test systems. *Z Ernährungswiss* 28:300-309.
- Nakajima M, Yamamoto T, Nunoya K, Yokoi T, Nagashima K, Inoue K, Funae Y, Shimada N, Kamataki T and Kuroiwa Y (1996) Role of human cytochrome P4502A6 in C-oxidation of nicotine. *Drug Metab Dispos* 24: 1212-1217.
- NIOSH AHSCN (1996) Southeast Center Studies Ways to Prevent Green Tobacco Sickness.
- Norppa H (2001) Genetic polymorphisms and chromosome damage. *Int J Hyg Environ Health* 204: 31-38.
- Norppa H (2004) Cytogenetic biomarkers and genetic polymorphisms. *Toxicol Lett* 149: 309-334.
- Nsouli B, Darwish T, Thomas J-P, Zahraman K and Roumie M (2004) Ni, Cu, Zn and Pb background values determination in representative Lebanese soil using the thick target PIXE technique. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B* 219-220: 181-189.
- Oliveira PPV, B. SC, Moura L, Malta DC, Torres MCA, Lima SMCP, Lima ALA, Leite CE, Costa-e-Silva VL, Sobel J and Lanzieri TM (2010) First reported outbreak of green tobacco sickness in Brazil. *Caderno de Saúde Pública* 26: 2263-2269.
- Omoniyi I, Agbon AO and Sodunke SA (2002) Effect of lethal and sublethal concentrations of tobacco (*Nicotiana tabacum*) leaf dust extract on weight and hematological changes in *Clarias gariepinus* (Burchell). *Journal of Applied Sciences & Environmental Management* 6: 37-41.
- Onuki M, Yokoyama K, Kimura K, Sato H, Nordin RB, Naing L, Morita Y, Sakai T, Kobayashi Y and Araki S (2003) Assessment of urinary cotinine as a marker of nicotine absorption from tobacco leaves: a study on tobacco farmers in Malaysia. *J Occup Health* 45: 140-145.
- Oscarson M (2001) Genetic polymorphisms in the cytochrome P450 2A6 (*CYP2A6*) gene: implications for interindividual differences in nicotine metabolism. *Drug Metab Dispos* 29: 91-95.
- Paiva JC, Cabral IO, Soares BM, Sombra CM, Ferreira JR, Moraes MO, Cavalcanti BC and Pessoa C (2011) Biomonitoring of rural workers exposed to a complex mixture of pesticides in the municipalities of Tianguá and Ubajara (Ceará state, Brazil): Genotoxic and cytogenetic studies. *Environ Mol Mutagen*.
- Pandey P, McGowen RM, Vogel EW and Butterworth FM (1995) Genotoxicity of polychlorinated biphenyl (PCB) and polynuclear aromatic hydrocarbon (PAH) mixtures in the white/white+ eye-mosaic assay. In: *Biomonitoring and Biomarkers as*

- Indicators of Environmental Change. Butterworth BE, Corkum LD, Guzmán-Rincón J (eds): Plenum Press, New York. pp 183 – 191.
- Panemangalore M, Dowla HA and Byers ME (1999) Occupational exposure to agricultural chemicals: effect on the activities of some enzymes in the blood of farm workers. *Int Arch Occup Environ Health* 72: 84-88.
- Parikh JR, Gokani VN, Doctor PB, Kulkarni PK, Shah AR and Saiyed HN (2005) Acute and chronic health effects due to green tobacco exposure in agricultural workers. *Am J Ind Med* 47: 494-499.
- Pasquini R, Scassellati-Sforzolini G, Angeli G, Fatigoni C, Monarca S, Beneventi L, DiGiulio AM and Bauleo FA (1996) Cytogenetic biomonitoring of pesticide-exposed farmers in central Italy. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 15:29-39.
- Pastor S, Lucero L, Gutierrez S, Durban R, Gomez C, Parron T, Creus A and Marcos R (2002) A follow-up study on micronucleus frequency in Spanish agricultural workers exposed to pesticides. *Mutagenesis* 17: 79-82.
- Pathak MK, Fareed M, Bihari V, Mathur N, Srivastava AK, Kuddus M and Nair KC (2011) Cholinesterase levels and morbidity in pesticide sprayers in North India. *Occup Med (Lond)*.
- Peamkrasatam S, Sriwatanakul K, Kiyotani K, Fujieda M, Yamazaki H, Kamataki T and Yoovathaworn K (2006) *In vivo* evaluation of coumarin and nicotine as probe drugs to predict the metabolic capacity of *CYP2A6* due to genetic polymorphism in Thais. *Drug Metab Pharmacokinet* 21: 475-484.
- Peixoto F (2005) Comparative effects of the Roundup and glyphosate on mitochondrial oxidative phosphorylation. *Chemosphere* 61: 1115-1122.
- Peres F e Moreira JC (2007) Saúde e ambiente em sua relação com o consumo de agrotóxicos em um pólo agrícola do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Caderno de Saúde Pública* 4: 612-621.
- Pitarque M, von Richter O, Oke B, Berkkan H, Oscarson M and Ingelman-Sundberg M (2001) Identification of a single nucleotide polymorphism in the TATA box of the *CYP2A6* gene: impairment of its promoter activity. *Biochem Biophys Res Commun* 284: 455-460.
- Poplawski T, Arabski M, Kozirowska D, Blasinska-Morawiec M, Morawiec Z, Morawiec-Bajda A, Klupinska G, Jeziorski A, Chojnacki J and Blasiak J (2006) DNA damage and repair in gastric cancer--a correlation with the *hOGG1* and *RAD51* genes polymorphisms. *Mutat Res* 601:83-91.
- Quandt SA, Arcury TA, Preisser JS, Norton D and Austin C (2000) Migrant farmworkers and green tobacco sickness: new issues for an understudied disease. *Am J Ind Med* 37: 307-315.
- Racowsky C, Hendricks RC and Baldwin KV (1989) Direct effects of nicotine on the meiotic maturation of hamster oocytes. *Reprod Toxicol* 3: 13-21.
- Ramirez A and Saldanha PH (2002) Micronucleus investigation of alcoholic patients with oral carcinomas. *Genet Mol Res* 1: 246-260.
- Ramos AF e Silva JF (2004) Exposição a Pesticidas, Atividade Laborativa e Agravos à Saúde. www.coopmedcombr/uploads/revistas_materias_61pdf.
- Ramos MC (2006) Metals in vineyard soils of the Penedes area (NE Spain) after compost application. *J Environ Manage* 78: 209-215.
- Relton CL, Daniel CP, Hammal DM, Parker L, Janet Tawn E and Burn J (2004) DNA repair gene polymorphisms, pre-natal factors and the frequency of somatic mutations in the glycophorin-A gene among healthy newborns. *Mutat Res* 545: 49-57.

- Remor AP, Totti CC, Moreira DA, Dutra GP, Heuser VD and Boeira JM (2009) Occupational exposure of farm workers to pesticides: biochemical parameters and evaluation of genotoxicity. *Environ Int* 35: 273-278.
- Ribas G, Frenzilli G, Barale R and Marcos R (1995) Herbicide-induced DNA damage in human lymphocytes evaluated by the single-cell gel electrophoresis (SCGE) assay. *Mutat Res* 344: 41-54.
- Ribeiro CC e Mella EAC (2007) Intoxicação por organofosforado - a importância da dosagem de colinesterase. *Iniciação Científica CESUMAR* 9: 125-134.
- Riebe M, Westphal K and Fortnagel P (1982) Mutagenicity testing, in bacterial test systems, of some constituents of tobacco. *Mutat Res* 101: 39-43.
- Rohlman DS, Anger WK and Lein PJ (2011) Correlating neurobehavioral performance with biomarkers of organophosphorous pesticide exposure. *Neurotoxicology* 32: 268-276.
- Rohr P (2008) Influência de polimorfismos em genes de reparo no risco ocupacional de viticultores do Rio Grande do Sul. *Dissertação de Mestrado em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul*:90p.
- Rohr P, da Silva J, Erdtmann B, Saffi J, Guecheva TN, Antonio Pegas Henriques J and Kvitko K (2011) BER gene polymorphisms (*OGG1 Ser326Cys* and *XRCC1 Arg194Trp*) and modulation of DNA damage due to pesticides exposure. *Environ Mol Mutagen* 52: 20-27.
- Roldan-Tapi L, Leyva A, Laynez F and Santed FS (2005) Chronic neuropsychological sequelae of cholinesterase inhibitors in the absence of structural brain damage: two cases of acute poisoning. *Environ Health Perspect* 113: 762-766.
- Rosman KJ, Chisholm W, Jimi S, Candelone JP, Boutron CF, Teissedre PL and Adams FC (1998) Lead concentrations and isotopic signatures in vintages of French wine between 1950 and 1991. *Environ Res* 78: 161-167.
- Ruttan CC and Glickman BW (2002) Coding variants in human double-strand break DNA repair genes. *Mutat Res* 509: 175-200.
- Sailaja N, Chandrasekhar M, Rekhadevi PV, Mahboob M, Rahman MF, Vuyyuri SB, Danadevi K, Hussain SA and Grover P (2006) Genotoxic evaluation of workers employed in pesticide production. *Mutat Res* 609: 74-80.
- Salvador M, Bordina DL, Andreazza AC, Da Silva J, Henriques JAP and Erdtmann B (2008) Determination of oxidative stress markers and serum cholinesterase among pesticide sprayers in southern Brazil. *Toxicol Environ Chem* 90: 809-814.
- Sanchez-Siles M, Ros-Llor I, Camacho-Alonso F and Lopez-Jornet P (2011) A novel application of the buccal micronucleus cytome assay in oral lichen planus: A pilot study. *Arch Oral Biol*.
- Sassen AW, Richter E, Semmler MP, Harreus UA, Gamarra F and Kleinsasser NH (2005) Genotoxicity of nicotine in mini-organ cultures of human upper aerodigestive tract epithelia. *Toxicol Sci* 88: 134-141.
- Scarpato R, Migliore L, Hirvonen A, Falck G and Norppa H (1996) Cytogenetic monitoring of occupational exposure to pesticides: characterization of *GSTM1*, *GSTT1*, and *NAT2* genotypes. *Environ Mol Mutagen* 27: 263-269.
- Schmitt NM, Schmitt J, Kouimintzis DM and Kirch K (2007) Health risks in tobacco farm workers—a review of the literature. *J Public Health* 15: 255-264.
- Schoenhals M, Follador FAC e da Silva C (2009) Análise dos impactos da fumicultura sobre o meio ambiente, à saúde dos fumicultores e iniciativas de gestão ambiental na indústria do tabaco. *Engenharia Ambiental - Espírito Santo do Pinhal* 6: 16-13.

- Schoket B, Papp G, Levay K, Mrackova G, Kadlubar F and, Vincze I (2001) Impact of metabolic genotypes on levels of biomarkers of genotoxic exposure. *Mutat Res* 482: 57-69.
- Sefrini G (1995) O fumo no Brasil e no mundo. AFUBRA Associação dos fumicultores do Brasil.
- Sexton K and Hattis D (2007) Assessing cumulative health risks from exposure to environmental mixtures - three fundamental questions. *Environ Health Perspect* 115: 825-832.
- Shadnia S, Azizi E, Hosseini R, Khoei S, Fouladdel S, Pajoumand A, Jalali N and Abdollahi M (2005) Evaluation of oxidative stress and genotoxicity in organophosphorus insecticide formulators. *Hum Exp Toxicol* 24: 439-445.
- Shaham J, Kaufman Z, Gurvich R and Levi Z (2001) Frequency of sister-chromatid exchange among greenhouse farmers exposed to pesticides. *Mutat Res* 491: 71-80.
- Shimizu N, Shingaki K, Kaneko-Sasaguri Y, Hashizume T and Kanda T (2005) When, where and how the bridge breaks: anaphase bridge breakage plays a crucial role in gene amplification and HSR generation. *Exp Cell Res* 302: 233-243.
- Silins I and Hogberg J (2011) Combined toxic exposures and human health: biomarkers of exposure and effect. *Int J Environ Res Public Health* 8: 629-647.
- Silva JJO, Alves SRA, Meyer A, Perez F, Sarcinelli PN, Mattos RCOC and Moreira JCCS (2001) Influence of social-economic factors on the pesticide poisoning, Brazil. *Revista de Saúde Pública* 35: 130-135.
- Singh S, Kumar V, Singh P, Thakur S, Banerjee BD, Rautela RS, Grover SS, Rawat DS, Pasha ST, Jain SK and Rai A (2011a) 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 and Rai A (2011b) Paraoxonase-1 genetic polymorphisms and susceptibility to DNA damage in workers occupationally exposed to organophosphate pesticides. *Toxicol Appl Pharmacol* 252: 130-137.
- Soares W, Almeida RMVR e Moro S (2003) Trabalho rural e fatores de risco associados ao regime de uso de agrotóxicos em Minas Gerais, Brasil. *Caderno de Saúde Pública* 19: 1117-1127.
- Sobkowiak R and Lesicki A (2009) Genotoxicity of nicotine in cell culture of *Caenorhabditis elegans* evaluated by the comet assay. *Drug Chem Toxicol* 32: 252-257.
- Sozmen B, Peker S, Kaya U, Erkan M and Sozmen EY (2007) Markers of long-term exposure to organophosphorus pesticides in farmers who work in viticulture and tobacco production in Turkey. *Toxicol Mech Methods* 17: 379-384.
- Stern MC, Umbach DM, van Gils CH, Lunn RM and Taylor JA (2001) DNA repair gene *XRCC1* polymorphisms, smoking, and bladder cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10: 125-131.
- Stützer G e Guimarães G (2003) Aspectos toxicológicos e ambientais relacionados com o uso de produtos fitossanitários. In: O que os engenheiros agrônomos devem saber para orientar o uso de produtos fitossanitários. Zambolim L (ed): Viçosa. pp 69-84.
- Swenberg JA (1993) Cell Proliferation and Chemical Carcinogenesis: summary and future directions. *Environ Health Perspect* 101: 153-158.

- Takezaki T, Gao CM, Wu JZ, Li ZY, Wang JD, Ding JH, Liu YT, Hu X, Xu TL, Tajima K and Sugimura H (2002) *hOGG1 Ser(326)Cys* polymorphism and modification by environmental factors of stomach cancer risk in Chinese. *Int J Cancer* 99: 624-627.
- Tamaki Y, Arai T, Sugimura H, Sasaki T, Honda M, Muroi Y, Matsubara Y, Kanno S, Ishikawa M, Hirasawa N and Hiratsuka M (2011) Association between Cancer Risk and Drug Metabolizing Enzyme Gene (*CYP2A6*, *CYP2A13*, *CYP4B1*, *SULT1A1*, *GSTM1*, and *GSTT1*) Polymorphisms in Japanese Cases of Lung Cancer. *Drug Metab Pharmacokinet*. [Epub ahead of print]
- Thomas P, Harvey S, Gruner T and Fenech M (2008) The buccal cytome and micronucleus frequency is substantially altered in Down's syndrome and normal ageing compared to young healthy controls. *Mutat Res* 638: 37-47.
- Thomas P, Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, Knasmueller S and Fenech M (2009) Buccal micronucleus cytome assay. *Nat Protoc* 4: 825-837.
- Tolbert PE, Shy CM and Allen JW (1991) Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: a field test in snuff users. *Am J Epidemiol* 134:840-850.
- Tricker AR (2003) Nicotine metabolism, human drug metabolism polymorphisms, and smoking behaviour. *Toxicology* 183: 151-173.
- Trivedi AH, Dave BJ and Adhvaryu SG (1990) Assessment of genotoxicity of nicotine employing *in vitro* mammalian test system. *Cancer Lett* 54: 89-94.
- Tsui MT and Chu LM (2008) Environmental fate and non-target impact of glyphosate-based herbicide (Roundup) in a subtropical wetland. *Chemosphere* 71: 439-446.
- Uuskula M, Jarventaus H, Hirvonen A, Sorsa M and Norppa H (1995) Influence of *GSTM1* genotype on sister chromatid exchange induction by styrene-7,8-oxide and 1,2-epoxy-3-butene in cultured human lymphocytes. *Carcinogenesis* 16: 947-950.
- Vasconcelos GM, Struchiner CJ and Suarez-Kurtz G (2005) *CYP2A6* genetic polymorphisms and correlation with smoking status in Brazilians. *Pharmacogenomics J* 5: 42-48.
- Videla LA, Fernandez V, Tapia G and Varela P (2003) Oxidative stress-mediated hepatotoxicity of iron and copper: role of Kupffer cells. *Biometals* 16: 103-111.
- Wang WW, Spurdle AB, Kolachana P, Bove B, Modan B, Ebbers SM, Suthers G, Tucker MA, Kaufman DJ, Doody MM, Tarone RE, Daly M, Levavi H, Pierce H, Chetrit A, Yechezkel GH, Chenevix-Trench G, Offit K, Godwin AK and Struwing JP (2001) A single nucleotide polymorphism in the 5' untranslated region of *RAD51* and risk of cancer among *BRCA1/2* mutation carriers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10: 955-960.
- Wang Y, Spitz MR, Zhu Y, Dong Q, Shete S and Wu X (2003) From genotype to phenotype: correlating *XRCC1* polymorphisms with mutagen sensitivity. *DNA Repair (Amst)* 2: 901-908.
- Weng Z, Lu Y, Weng H and Morimoto K (2008) Effects of the *XRCC1* gene-environment interactions on DNA damage in healthy Japanese workers. *Environ Mol Mutagen* 49: 708-719.
- Wetscher GJ, Bagchi M, Bagchi D, Perdakis G, Hinder PR, Glaser K and Hinder RA (1995) Free radical production in nicotine treated pancreatic tissue. *Free Radic Biol Med* 18: 877-882.
- Wilkinson J and Clapper ML (1997) Detoxification enzymes and chemoprevention. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 216: 192-200.
- Wong RH, Chang SY, Ho SW, Huang PL, Liu YJ, Chen YC, Yeh YH and 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: 168-175.
- Wu X, Shi H, Jiang H, Kemp B, Hong WK, Delclos GL and Spitz MR (1997) Associations between cytochrome *P4502E1* genotype, mutagen sensitivity, cigarette smoking and susceptibility to lung cancer. *Carcinogenesis* 18: 967-973.
- Yamane A, Kohno T, Ito K, Sunaga N, Aoki K, Yoshimura K, Murakami H, Nojima Y and Yokota J (2004) Differential ability of polymorphic OGG1 proteins to suppress mutagenesis induced by 8-hydroxyguanine in human cell *in vivo*. *Carcinogenesis* 25: 1689-1694.
- Yildiz D, Liu YS, Ercal N and Armstrong DW (1999) Comparison of pure nicotine- and smokeless tobacco extract-induced toxicities and oxidative stress. *Arch Environ Contam Toxicol* 37: 434-439.
- Zero Hora (2009) Ministério da Saúde investiga doença provocada pelo manuseio de fumo em Candelária, RS. In: www.zerohora.clicrbs.com.br/zerohora
- Zero Hora (2009) Trabalhadores de Candelária podem estar com a doença da folha verde do tabaco. In: www.zerohora.clicrbs.com.br/zerohora
- Zorin S, Kuylenstierna F and Thulin H (1999) *In vitro* test of nicotine's permeability through human skin. Risk evaluation and safety aspects. *Ann Occup Hyg* 43: 405-413.

ANEXOS

TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO

1. Dados de Identificação do Projeto de Pesquisa

- 1.1. Título: Avaliação da Genotoxicidade Ocasionalada pela Exposição Ocupacional em Fumicultores Associada à Suscetibilidade Genética.
- 1.2. Unidade executora: Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Campus do Vale, Porto Alegre – RS.
- 1.3. Locais de coleta: Município de Venâncio Aires – Rio Grande do Sul.
- 1.4. Pesquisadores: Prof^ª. Dr^ª. Kátia Kvitko e Prof^ª. Dr^ª. Juliana da Silva
Ms. Fernanda Rabaioli da Silva
Endereço para contato: katia.kvitko@ufrgs.br
- 1.5. Telefone da pesquisadora responsável: 51 3308 6740
- 1.6. Objetivos do projeto: avaliar a genotoxicidade em fumicultores gaúchos durante exposição aos pesticidas naturais e sintéticos nas lavouras de fumo, correlacionando os resultados com a suscetibilidade genética individual e com os biomarcadores bioquímicos.

2. Informações ao voluntário

- 2.1. Participação no projeto: o voluntário participará deste projeto através da doação de sangue e de mucosa oral para realização de análises bioquímicas e genéticas. Além disso, deverá responder ao questionário específico.
- 2.2. Duração da atividade: aproximadamente 30 minutos.
- 2.3. Descrição dos procedimentos: os indivíduos serão reunidos; no primeiro momento a proposta da pesquisa e o questionário a ser preenchido serão apresentados. Após o esclarecimento das possíveis dúvidas e o preenchimento do questionário, o indivíduo será conduzido ao profissional habilitado, este irá retirar 20ml de sangue utilizando seringa descartável e separar-lo em tubos estéreis destinados aos diferentes testes. O profissional irá fazer a raspagem da mucosa bucal do mesmo indivíduo usando swab descartável e irá preparar a lâmina. No final da pesquisa, o

participante será convidado a uma reunião organizada pelos pesquisadores que terá como intuito apresentar os resultados à comunidade.

- 2.4. Riscos e desconfortos: não há riscos para o voluntário participante do projeto. O desconforto previsto resume-se à retirada de uma amostra de aproximadamente 10 ml de sangue venoso do braço direito ou esquerdo.
- 2.5. Benefícios esperados: os resultados do exame clínico e laboratorial serão comunicados ao voluntário que ficará ciente da presença ou não de resíduos de agrotóxicos no organismo. Será dada orientação a respeito dos riscos inerentes ao uso de pesticidas e a necessidade da utilização dos equipamentos de segurança.
- 2.6. Critérios de confidencialidade, privacidade e anonimato: todas as análises serão realizadas de forma confidencial, não sendo identificado o voluntário. Os resultados serão informados diretamente ao voluntário pela coordenação do projeto. As publicações não incluirão qualquer referência ao nome do doador ou outros dados que possam identificá-lo.
- 2.7. Destino do material biológico coletado: após a realização das análises químicas e bioquímicas as amostras de sangue serão descartadas, não podendo ser utilizadas para outros fins. As amostras de DNA ficarão armazenadas sob forma de banco de DNA no laboratório de Imunogenética da UFRGS, sob responsabilidade da Dr^a. Kátia Kvitko. As amostras de DNA poderão ser reanalisadas com outros marcadores moleculares, quando houver interesse e recursos para isto, apenas com a autorização do participante.

3. Consentimento do voluntário

Eu,, após ler este documento e uma vez esclarecida a minha participação no projeto de pesquisa aqui referido, concordo em:

- a- responder adequadamente ao questionário em anexo;
- b- doar uma amostra de sangue venoso, coletada por profissional habilitado, com material totalmente descartável, a qual será utilizada para realização de análises químicas e bioquímicas com o objetivo de avaliar o nível de intoxicação por pesticidas;

- c- permitir raspagem da mucosa bucal, com material descartável, à realização do Teste de Micronúcleo e dosagem de Cotinina.
- d- autorizo a utilização da minha amostra de DNA para outros estudos similares de polimorfismos em marcadores de suscetibilidade () Sim () Não

Assinatura do voluntário:

Assinatura do coordenador do projeto:

Local e data:

QUESTIONÁRIO PESSOAL

1. Idade: _____ em anos
2. Data de nascimento: ____/____/____
3. Sexo: ()M ()F
4. Grupo Étnico: () negro; () chinês; () japonês; () outros orientais; () indígena; () latino-americano; () europeu; () asiático
5. Estado civil:
6. N. de filhos:
7. Emprego anterior:
8. Função que exercia:
9. No seu emprego anterior já se expôs a algumas destas substâncias? (informe tempo de exposição): () derivados do petróleo _____ ; () tintas/corantes _____ ; () solventes _____ ; () pesticidas/herbicidas _____ ; () mercúrio/vapores de outros metais pesados – quais? _____; () outras substâncias químicas – quais? _____
10. Função atual:
11. Tempo de serviço:
12. No seu emprego atual já se expôs a algumas destas substâncias? (informe tempo de exposição): () derivados do petróleo _____ ; () tintas/corantes _____ ; () solventes _____ ; () pesticidas/herbicidas _____ ; () mercúrio/vapores de outros metais pesados – quais? _____; () outras substâncias químicas – quais? _____
13. Tipos de pesticidas que trabalha: () carbamatos; () organofosforados; () piretróides; () organoclorados
14. De que forma é aplicado? () trator; () bomba costal; () avião; () outros – Quais: _____
15. Meses do ano que é aplicado (todos):
16. Mês(es) que é mais aplicado:
17. Periodicidade (todos os dias?):
18. Utiliza equipamento de segurança: () sim () não
19. Quando foi a última vez que foi aplicado?
20. Você come enquanto aplica ou logo após aplicar o agrotóxico? () sim () não
21. Se sim, Lava as mãos antes de pegar nos alimentos? () sim () não
22. Já fumou? () sim () não – se não vá para 26

23. Quantos anos?
24. Ainda fuma? () sim () não – se não há quantos anos parou?
25. Se sim, quantos cigarros por dia? () menos de meio maço; () de meio a um maço; () 1-2 maços; () mais de 2 maços
26. Fuma também: () cigarros de palha () cachimbo – quantas vezes ao dia: _____
27. Medicamentos utilizados rotineiramente / indicar a frequência: () vitaminas e suplementos; () pílulas para pressão; () antibióticos; () insulina; tranqüilizantes; () relaxantes musculares; () outros: _____
28. Está fazendo algum tratamento? () sim () não – Qual?
29. Consome bebidas alcoólicas? () sim () não – Qual? Frequência:
30. Ingere frutas e verduras? () sim () não – Qual? Frequência:
31. Ingere carnes (não só vermelha)? () sim () não – Qual? Frequência:
32. Preferência das carnes: () crua; () mal passada; () bem passada / () gorda; () magra
33. Doenças já contraídas: () câncer; () aids; () diabete; () anemia; () doenças cardíacas; () outras - _____
34. Tem conhecimento de algum defeito de nascimento ou doença hereditária que afetem seus pais, irmãos, irmãs ou cônjuges? () sim () não - _____
35. Você e cônjuge já tiveram dificuldades em conceber (mais de doze meses) ou já foram diagnosticados como estéreis? () sim () não - _____
36. Histórico de aborto espontâneo? () sim () não - _____
37. Histórico de bebês com defeitos? () sim () não - _____
38. Possui irmão gêmeo idêntico? () sim () não
39. Casos de câncer na família: () sim () não – grau de parentesco - _____
- Tipos de cânceres: () pele; () mama; () leucemia; () esôfago; () ou
40. Após manipular as folhas de fumo quais sintomas já demonstrou:
- () Tontura () Dor de cabeça () Diarréia () Fraqueza
- () Cólica () Perda do apetite () Visão embaçada
- () Lacrimejar constante () Dificuldade em respirar Outros: _____

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul analisou o projeto:

Número : 2007835

Título : AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE OCASIONADA PELA EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL EM FUMICULTORES ASSOCIADA À SUSCETIBILIDADE GENÉTICA.

Pesquisador (es) :

<u>NOME</u>	<u>PARTICIPAÇÃO</u>	<u>EMAIL</u>	<u>FONE</u>
KATIA KVIKTO	PESQ RESPONSÁVEL	katia.kvitko@ufrgs.br	33087754
FERNANDA RABAIOLI DA SILVA	PESQUISADOR	00098171@ufrgs.br	
JULIANA DA SILVA	PESQUISADOR	juliana@if1.if.ufrgs.br	33087754

O mesmo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS, reunião nº , ata nº , de , por estar adequado ética e metodologicamente e de acordo com a Resolução 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde.

Porto Alegre, quarta-feira, 15 de abril de 2009



ILMA SIMONI BRUM DA SILVA
Coordenador do CEP-UFRGS