

Expressão comparativa de P53 entre indivíduos expostos e não expostos aos agrotóxicos

Reginaldo Rodrigues Vicente¹ e Carlos Eduardo Coral de Oliveira¹

¹Faculdade Assis Gurgacz – FAG, Curso de Ciências Biológicas. Avenida das Torres n. 500, CEP: 85.806-095, Bairro Santa Cruz, Cascavel, PR.

rodriguesrv@msn.com, carloseduardo@fag.edu.br

Resumo: A intoxicação com agrotóxicos por longos períodos e em baixas concentrações ocasiona variados efeitos crônicos, entre eles o câncer. A expressão da proteína P53, gene supressor de tumores, desempenha um papel central no processo de resposta celular, atuando diretamente no ciclo celular permitindo o reparo do dano no DNA, ou indução da morte celular. Na P53 selvagem, a degradação ocorre logo após a síntese, já formas mutadas da proteína têm a meia vida aumentada e se acumulam, acarretando assim em uma maior expressão. O presente trabalho visa avaliar o nível de expressão da P53 em indivíduos expostos e não expostos aos agrotóxicos. Quinze amostras de sangue periférico coletados de indivíduos expostos ocupacionalmente, familiares e indivíduos não expostos ocupacionalmente foram utilizadas para extração de RNA pelo método de Trizol. Em seguida, foi realizada uma reação de RT-PCR para avaliação da expressão da P53. Os resultados demonstram uma pequena expressão em todos os grupos do estudo indicando pouca correlação entre a produção de P53 e a exposição aos agrotóxicos. A avaliação da expressão desta proteína é, portanto, um fato a ser melhor compreendido para se avaliar o seu envolvimento com a carcinogênese após exposição aos agrotóxicos.

Palavras-chave: Gene supressor, carcinogênese, tóxicos.

**Comparative expression of P53 among people exposed and people not exposed to
agrotoxic**

Abstract: The poisoning with agro toxic for long periods and in low concentrations causes varied chronic effects, between them the cancer. The expression of the P53 protein, a suppressor of tumors gene, plays a central role in the process of cellular replication, acting directly in the cellular cycle allowing the repair of the damage in the DNA, or induction of the cellular death. In the wild P53, the degradation occurs after the synthesis while mutated forms of the protein have the half life increased and they accumulate, thus causing a stronger expression. The present work aims at evaluate the level of expression of the P53 in individuals exposed and not exposed to the agro toxic. Fifteen samples of peripheral blood collected of exposed, familiar individuals and individuals occupationally not exposed had been used for extraction of RNA through the Trizol method. After that, a reaction of RT-PCR for evaluation of the expression of the P53 was carried out. The results demonstrate a small expression in all the groups of the study indicating little correlation between the production of P53 and the exposition to the agro toxic. The evaluation of the expression of this protein is, therefore, a fact to be better understood to evaluate its involvement with carcinogenesis after the exposition to the agro toxic.

Key words: Gene suppressor, carcinogenic, toxics.

Introdução

O Brasil é um dos países líderes no consumo de agrotóxicos, onde se incluem uma numerosa gama de produtos com variadas composições (Pessoa *et al*, 2002; Faria *et al*, 2007). Atualmente cerca de 600 princípios ativos de agrotóxicos e 50 mil formulações comerciais se encontram disponíveis, sendo constantemente utilizadas para o combate a doenças, na agricultura ou no controle sanitário nas áreas urbanas (Teixeira *et al*, 2003).

A utilização desses produtos de forma ampla, a falta do conhecimento dos riscos associados a sua utilização, o conseqüente desrespeito às normas básicas de segurança, a livre e fácil aquisição comercial, e a grande pressão do sistema executada pelas empresas distribuidoras e produtoras, constituem importantes causas que favorecem o agravamento dos quadros de contaminação humana e ambiental causada pelos agrotóxicos (Silva *et al*, 2002).

Segundo Faria *et al* (2007), a Organização Internacional do Trabalho/ Organização Mundial da Saúde (OIT/OMS) estima que, nos países em desenvolvimento os trabalhadores expostos aos agrotóxicos tem sofrido anualmente cerca de 70 mil intoxicações agudas e crônicas que evoluem para óbito, e aproximadamente 7 milhões de doenças crônicas e agudas não-fatais.

Os chamados efeitos crônicos, relacionados com exposições por longos períodos e em baixas concentrações, têm seu reconhecimento clínico bem mais dificultoso, fato agravado pela exposição a múltiplos contaminantes. Portanto há, neste caso, maior dificuldade para o reconhecimento de uma associação causa/efeito. Dos inúmeros efeitos crônicos que atuam sobre a saúde humana são mais evidentes e descritas as alterações imunológicas e genéticas, malformações congênitas, câncer, efeitos deletérios sobre o sistema nervoso, hematopoético, respiratório, cardiovascular, geniturinário, trato gastrointestinal, hepático, endócrino, reprodutivo, olhos e pele, além de reações alérgicas a estas drogas, alterações comportamentais entre outros (Silva *et al*, 2005).

Os agrotóxicos têm potencial para induzir o câncer por mecanismos variados através da genotoxicidade e da promoção de tumores (Ribeiro *et al*, 2003; Bedor, 2008). Pinho (2000) destaca o recente crescimento e desenvolvimento da biologia molecular como um importante instrumento no estudo do câncer. Nesse processo as análises moleculares envolvendo alterações genéticas têm sido constantemente estudadas para detectar a carcinogênese (Pohl *et al*, 2002).

Entre os variados marcadores da carcinogênese, a expressão da proteína P53 demonstra uma correlação direta com esse processo (Itzkowitz, 2003). A proteína 53 (P53) é codificada no gene TP53 localizado no cromossomo 17, cuja, sua principal função é preservar a integridade do código genético, mantendo a seqüência igual de nucleotídeos no DNA em todas as células do corpo (Martinez *et al*, 2004; Pinho, 2000). Sendo assim o gene TP53, é considerado como o “guardião do

genoma”, dentre todos aqueles reconhecidamente envolvidos nos processos de carcinogênese, é o de maior importância (Conte e Salles, 2002).

A P53 atua na célula, impedindo a proliferação celular após um dano no DNA e ativando a apoptose, no caso de um dano irreparável (Osin e Lakhani, 1999; Borresen, 2003).

Na célula, a P53 selvagem se encontra em baixa concentração por atuar com uma meia-vida curta, de aproximadamente 20 minutos (Reihnsaus *et al*, 1990). E embora a P53 selvagem seja expressa em níveis baixos nas células normais, a P53 mutada apresenta alta expressão e uma meia vida mais longa, que a torna cumulativa (Reich *et al*, 1983).

Conhecer os mecanismos de ação e o potencial da expressão da P53 representa um desafio importante para se compreender os aspectos da biologia molecular relacionados ao câncer (Conte e Salles, 2002). Desta forma, este trabalho propôs-se avaliar a expressão gênica da P53 em indivíduos expostos ocupacionalmente aos agrotóxicos, familiares dos expostos com residência na área rural, e indivíduos sem exposição direta aos agrotóxicos.

Material e Métodos

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética Humana em pesquisa da Faculdade Assis Gurgacz – Cascavel/PR, estando de acordo com a Resolução 196/96 – CNS. Foram selecionados 5 indivíduos ocupacionalmente expostos aos agrotóxicos, 5 familiares dos indivíduos ocupacionalmente expostos aos agrotóxicos, sendo apenas um familiar para cada um dos expostos ocupacionais e 5 indivíduos não expostos diretamente, sem distinção de sexo, da população da região Oeste do Paraná – PR. A amostragem foi executada avaliando-se os números de residências ou propriedades rurais de número ímpar, para a abordagem dos voluntários. As propriedades rurais selecionadas tinham acesso facilitado.

Após o contato com os sujeitos, o projeto de pesquisa foi devidamente apresentado, explicando os objetivos do mesmo, os procedimentos e os critérios de inclusão na pesquisa.

Pela metodologia de Vacuteiner, foi realizada uma coleta de 8 mL de sangue periférico, dos participantes do projeto através de punção venosa. O material foi guardado em refrigeração (4-8°C) durante 24 horas até o seu processamento.

O RNA dos leucócitos foi extraído a partir da adição do reagente Trizol LS (Invitrogen, EUA), segundo as especificações do fabricante. Após a extração do RNA, este foi ressuspensionado em água ultra-pura (*Milli-Q*) tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) e quantificado por espectrofotometria em 260nm. A concentração de RNA foi ajustada para 10 ng/μL, sendo o RNA armazenado a -20 °C.

A avaliação da expressão gênica da P53 foi realizada por reação de transcriptase reversa, associada à reação em cadeia da polimerase (RT-PCR).

A transcrição reversa foi realizada a partir de: 6µL de RNA com 2,5µL de oligonucleotídeos (primer) do primeiro PCR (p53B) para *TP53*, dNTP 10µL, MgCl₂ 25µL, H₂O DEPC (dietilpirocarbonato) 2,5µL, MULV Reverse Transcriptase (*Invitrogen Life Technologies*, EUA) 2,0µL, Ribonuclease Inibidor (*Invitrogen Life Technologies*, EUA) 2,0µL. A reação foi efetuada em tampão específico Buffer 10X (50mM Tris-HCl pH 8.3, 75mM KCl) 2,0µL e submetida ao termociclador (*Eppendorf ThermalCycler*, EUA), à 42°C por 60min.

Os oligonucleotídeos utilizados para amplificação do gene TP53 por PCR foram sintetizados de acordo com a sequência depositada no GenBank sobre acesso do número NM_001126117.1 (p53A 5' GCGCACAGAGGAAGAGAATC 3', p53B 5' CGGTGAAGTGGGCCCCTACCTA 3').

As condições da reação de amplificação foram: Buffer PCR 10X 2,5µL, MgCl₂ 50mM 0,75µL, dNTP 10mM 2,0µL, p53A 2,5µM 1,5µL, p53B 2,5µM 1,5µL, Taq polimerase (1:10) 2,5µL, 2,0µL DNase e 12,75µL de H₂O PCR.

No termociclador, os ciclos consistiram em uma temperatura inicial de desnaturação a 94°C durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos de trinta segundos a 94°C, quarenta e cinco segundos a 55° para o anelamento e trinta segundos a 72°C. Em seguida, um ciclo de 10 minutos a 72°C foi realizado para extensão das fitas.

O produto da amplificação foi analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% e visualizado por coloração de nitrato de prata. Todas as reações foram realizadas com um controle negativo.

Resultados e Discussão

Dos 15 indivíduos, sendo cinco de cada um dos grupos, resultou no total quinze amostras finais para análises de expressão P53.

Foi observada uma pequena expressão da P53 nos 3 grupos de estudo. A amplificação *in vitro* do gene TP53 foi eficiente, pois ocorreu amplificação de fragmentos de 798 pares de bases específicos e de tamanho correspondente ao esperado na reação.

A expressão da P53 nos indivíduos analisados pode ser observada na banda dos 798 pares de bases, após eletroforese em gel de acrilamida a 10%, conforme demonstra a Figura 1.

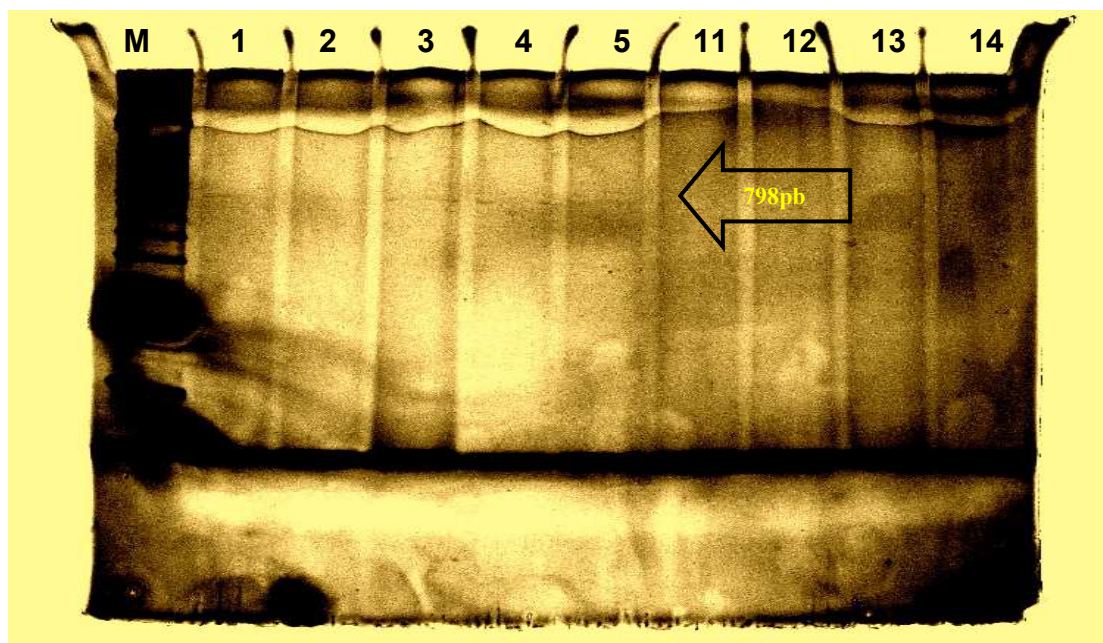


Figura 1 - Eletroforese em Gel de Acrilamida 10% corado com nitrato de prata, dos produtos do RT-PCR para p53. O fragmento de 798pb, corresponde ao RNAm do p53. M: marcador de peso molecular (100pb).

Os resultados demonstram que houve uma pequena expressão em todos os grupos de indivíduos analisados, demonstrando uma possível participação da P53 em atividades normais das células.

Atualmente sabe-se que alimentos provenientes de atividades agrícolas podem apresentar potencial contaminador mesmo para aqueles que nunca tiveram contato com agrotóxicos de forma ocupacional. Portanto, indivíduos não expostos de forma ocupacional estão constantemente relacionados à exposição por fatores secundários, o que pode explicar maior expressão no grupo dos não expostos (Grisolia, 2005).

A exposição aos agrotóxicos através de seus efeitos químicos certamente atua como agente carcinogênico. A P53 expressa nas amostras dos indivíduos expostos demonstra concordância com a literatura sobre o potencial carcinogênico gerado pelos agrotóxicos (Grisolia, 2005).

Segundo Reihnsaus e colaboradores o gene TP53 tem um papel crítico na carcinogênese, entretanto o papel preciso de sua expressão alterada em diferentes etapas ainda é incerto.

A P53 atua no processo de divisão celular e efetua a verificação do DNA, assim se ocorrer alguma mutação na célula devido a um erro de replicação, a P53 através de uma cascata de reações vai impedir que essa célula entre em mitose. No entanto, dois caminhos podem ser seguidos: a

correção da mutação através da ativação de proteínas de reparo ou a indução da morte celular através de apoptose (Pinho, 2000).

Stoppelli e Magalhães (2005), destacam ser difícil estabelecer uma relação entre o surgimento de câncer nos trabalhadores que executam atividades com agrotóxicos com o tempo de exposição e os tipos de produtos utilizados.

Algumas pesquisas já descritas como a de Koifman *et al* (2002) demonstraram a ocorrência de câncer de testículo em municípios com níveis altos de produção agrícola nos Estados de São Paulo e do Rio Grande do Sul. Outro trabalho em 1998, desenvolveu um estudo epidemiológico em Bogotá, Colômbia, com um total de 306 mulheres, avaliando a associação entre o risco de neoplasia e os níveis do agrotóxico DDE – diclorodifenildicloroetano – no soro sanguíneo. De fato essa associação sugeriu um aumento do risco relativo de 1,95 através da exposição ao DDE (Contreas *et al*, 1998; Stoppelli e Magalhães, 2005). Portanto, evidencia-se cada vez mais uma relação direta entre o câncer e a exposição aos agrotóxicos (Stoppelli e Magalhães, 2005).

Para a maioria das substâncias químicas, evidências científicas relacionadas aos mecanismos carcinogênicos ainda requerem maiores estudos para a elucidação do efeito dos agrotóxicos sobre as células (Bedor, 2008).

A P53 representa um grande marcador genético da carcinogênese e o significado de sua expressão em células de indivíduos expostos aos agrotóxicos representa um desafio a ser transposto (Castro, 2007).

Conclusões

Os resultados do presente estudo demonstraram uma expressão gênica de p53 semelhante em todos os grupos avaliados, indicando uma possível participação deste gene no desenvolvimento de atividades normais da célula, como na correção de erros no DNA, seja por supressão da célula mutada ou indução de apoptose.

Estes resultados sugerem que outros fatores podem estar envolvidos na regulação da p53 e que novos estudos são necessários para se compreender a relação entre a exposição humana aos agrotóxicos e o desenvolvimento do câncer.

Referências

BEDOR, C.N.G. **Estudo do potencial carcinogênico dos agrotóxicos empregados na fruticultura e sua aplicação para a vigilância da saúde**. 2008. 115p. Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2008.

BORRESEN, D. Department of Genetics, Institute for Cancer Research, The University Hospital, The Norwegian Radium Hospital, Montebello, Oslo, Norway . **TP53 and breast cancer**. Hum Mutat, v.21, nº3, p.292-300, 2003. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12619115>. Acesso em: 06 de julho de 2010.

CASTRO, I.A. **Expressão da proteína P53 em diferentes níveis de fotoenvelhecimento de pele**. 2007. 68p. Tese (Mestre em Ciências Médicas) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

CONTE, A.C.F.; SALLES, A.B.C.F. A importância do gene P53 na carcinogênese humana. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São José do Rio Preto (SP), v.24, nº2, p.85-89, 2002.

CONTRERAS, O.P.; VILLAMIL, R.J.; POSSO, V.H.J.; CORTEZ J.E. Organochlorine exposure and breast cancer risk in Colombian women. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro (RJ), v.14, nº3, p.125-132, 1998.

FARIA, N.M.X.; FASSA, A.G.; FACCHINI, L.A. Pesticides poisoning in Brazil: the official notification system and challenges to conducting epidemiological studies. **Ciência e Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro (RJ), v.12, nº1, p.25-38, 2007.

GRISOLIA, C. K. **Agrotóxicos, mutações, câncer e reprodução**. Brasília: Editora UnB 2005. 392 p.

ITZKOWITZ, S. Colon carcinogenesis in inflammatory bowel disease: applying molecular genetics to clinical practice. **Journal of Clinical Gastroenterology**, New York, v.38, nº5, p.70-74, 2003.

KOIFMAM, S.; MEYER, A.; JORGE-KOIFMAM, R. Human reproductive system disturbances and pesticide exposure in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro (RJ), v.18, nº2, p.435-445, 2002.

MARTINEZ, A.; BELLOSILLO, B.; BOSCH, F.; FERRER, A.; MARCÉ, S.; VILLAMAR, N. Nuclear survivin expression in mantle cell lymphoma is associated with cell proliferation and survival. **American Journal Pathology**, Maryland (USA), v.164, n.2, p.501-510, 2004.

OSIN, P.P.; LAKHANI, S.R. The pathology of familial breast cancer: Immunohistochemistry and molecular analysis. **Breast Cancer Research**, Maryland (USA), v.1, nº1, p.36-40, 1999.

PESSOA, B.; ALVES, M.; ADAD, L. **Biomonitoramento ocupacional de trabalhadores expostos a agrotóxicos com a aplicação do teste de micronúcleos e análise de polimorfismos**. Disponível em <http://www.ifpi.edu.br/eventos/iiencipro/arquivos/SAUDE/d9e569a42abaea658cafa9727ea4085c.pdf>. Acesso em 04 de março de 2010.

PINHO, M.S.L. Proteína P53: algum valor clínico ou apenas pesquisa? Uma revisão da literatura. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, Rio de Janeiro (RJ), v.20, nº4, p.258-260, 2000.

POHL, C.; HOMBACH, A.; KRUIS, W. Chronic inflammatory bowel disease and cancer. **Journal Hepato Gastroenterology**, Stuttgart (Alemanha), v.47, n.31, p.57-70, 2000.

REICH, N.C.; OREN, M.; LEVINE, A.J. Two distinct mechanisms regulate the levels of a cellular tumor antigen, p53. **Molecular and Cellular Biology**, v.3, nº12, p.2143-50, 1983.

REIHS AUS, E.; KOHLER, M.; KRAISS, S.; OREN, M.; MONTENARH, M. Department of Biochemistry, University of Ulm, Federal Republic of Germany. **Regulation of the level of the oncoprotein p53 in non-transformed and transformed cells. Oncogene** v.5, nº1, p.137-45, 1990. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2157179>. Acesso em 04 de março de 2010.

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese ambiental**. Canoas (RS) Editora: Ulbra, 2003. p.355.

SILVA, M. J.; NOVATO-SILVA, E.; FARIA, H.P., PINHEIRO, T.M.M. Agrotóxicos e trabalho: uma combinação perigosa para a saúde do trabalhador rural. **Ciência e Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, vol.10, nº4, p.891-903, 2005.

SILVA, O.J.J.; ALVES, S.R.; MEYER, A.; SARCINELLI, P.N.; MATTOS, R.C.O; MOREIRA, J.C. Influência de fatores socioeconômicos na contaminação por agrotóxicos, Brasil. **Revista Saúde Pública**, São Paulo, v.35, nº2, p.130-135, 2001.

STOPPELLI, I.M.B.S.; MAGALHÃES, C.P. Saúde e segurança alimentar: a questão dos agrotóxicos. **Ciência e Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v.10, nº0, p.91-100, 2005.

TEXEIRA, C.F.; AUGUSTO, L.G.S.; MORATA, T.C. Saúde auditiva de trabalhadores expostos a ruídos e inseticidas. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v.37, n.4, p.417-423, 2003.

Recebido em: 16/08/2010

Aceito para publicação em: 20/09/2010