
Tabaco em Foco: Avaliação dos Efeitos Genotóxicos do Extrato de Folhas Secas em Células HepG2 e em Trabalhadores Expostos Durante a Classificação das Folhas

SERPA, Enaile Tuliczewski¹; BORGES, Malu Siqueira²; GARCIA, Ana Letícia Hilario³; DALBERTO, Daiana³; DA SILVA, Juliana^{4,5}

¹Acadêmico do Curso de Ciências Biológicas/ULBRA – Bolsista CNPq/ULBRA, ²Mestranda em Biologia Celular e Molecular Aplicado à Saúde (PPGBioSaúde)/ULBRA, ³Pós-doutoranda Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento Humano (PPGSDH)/La Salle, Orientadora e Professora do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicado à Saúde PPGBioSaúde/ULBRA, ⁵Orientadora e professora no Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento Humano (PPGSDH)/La Salle.

daianapru@yahoo.com.br

Resumo

A cultura do tabaco é muito difundida na região sul do Brasil. Na composição das folhas secas do tabaco se encontram resquícios de agroquímicos, além da nicotina, que é o principal componente do tabaco, e as nitrosaminas específicas do tabaco (TSNAs). Estes compostos são conhecidos por causarem danos ao DNA. Diante disto, este trabalho avaliou os efeitos genotóxicos causados por um extrato aquoso preparado com o pó do tabaco seco, em células HepG2, e os efeitos genotóxicos causados pelo tabaco seco em trabalhadores expostos durante o período de classificação da folha seca. A metodologia utilizada foi o Ensaio Cometa alcalino. O extrato induziu danos às células HepG2 nas duas maiores concentrações. Já nos trabalhadores do tabaco, homens e mulheres demonstraram aumentos significativos de danos ao DNA quando comparados aos seus grupos controles. Esses achados reforçam a necessidade de medidas preventivas para reduzir a exposição ao tabaco seco durante as atividades destes trabalhadores.

Palavras-chave: Tabaco seco, Ensaio Cometa, HepG2, genotoxicidade.

Abstract

Tobacco culture is extremely widespread in the southern region of Brazil. Residues of agrochemicals, as well as nicotine, which is the main component of tobacco, and specific tobacco-specific nitrosamines (TSNAs) can be found in the composition of dried tobacco leaves. These compounds, individually or in combination, are known to cause DNA damage. Considering this, our study evaluated the genotoxic effects caused by an aqueous extract prepared from dried tobacco powder on HepG2 cells, as well as the genotoxic effects caused by dried tobacco on workers exposed during the period of dry leaf classification. The alkaline Comet assay was used as the methodology for genotoxicity evaluation. The extract induced damage to HepG2 cells at the two highest concentrations. In the tobacco workers, both men and women showed significant increases in DNA damage compared to their control groups. These findings reinforce the need for preventive measures to reduce exposure to dried tobacco during the activities of these workers.

Keywords: Dry tobacco, Comet Assay, HepG2, genotoxicity.

Introdução

Segundo historiadores, acredita-se que o tabaco (*Nicotiana tabacum*) tenha surgido na América, mais precisamente nos vales orientais dos Andes Bolivianos, sendo cultivados por povos indígenas tanto na América do Sul quanto na América do Norte, e foi difundida no território brasileiro através das migrações indígenas. Atualmente o cultivo de tabaco possui uma elevada importância econômica e social para o Brasil principalmente na região sul onde está presente em aproximadamente 556 municípios do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná, sendo cultivado em mais de 280 mil hectares, com cerca de 150 mil produtores integrados. No Brasil, a espécie *Nicotiana tabacum* L. é a mais cultivada, sendo submetida à cura natural ou artificial, destinadas à fabricação de cigarros, desfiados, entre outros (Santos e Deponti, 2021; SINDITABACO, 2023).

A exposição aguda à nicotina é conhecida como a doença da folha verde (*Green Tobacco Sickness - GTS*) (Alkam e Nabeshima, 2019). Devido ao contato direto com a planta durante o manuseio, ocorre uma absorção elevada de nicotina que é absorvida através da pele dos fumicultores. A GTS é uma doença ocupacional que já foi relatada por trabalhadores do tabaco em todo o mundo. Os trabalhadores sentem náusea, vômito, dor de cabeça, cólicas abdominais, dificuldade para respirar, temperatura corporal anormal, palidez, diarreia, entre outros (Da Silva et al., 2014; Saleeon et al., 2016; Alkam e Nabeshima, 2019; Alves et al., 2020).

A nicotina representa cerca de 90% dos alcalóides encontrados na planta do tabaco e os demais 10% são representados por nornicotina, anatabina e anabasina (Umadevi et al., 2003; Konstantinou et al., 2018; Alkam e Nabeshima, 2019). Acredita-se que esses alcalóides surjam durante o processamento do tabaco devido à ação bacteriana ou processo de oxidação, e suas aminas são as responsáveis pela formação das nitrosaminas específicas do tabaco (TSNAs) devido a sua reação com agentes nitrosantes (Konstantinou et al., 2018). As principais nitrosaminas são NNK [4-(metilnitrosamino)-abuta-noal], NNN [N'-nitrosornicotina], NAT [N'-nitrosoanatabina], NAB [N'-nitrosoanabasina], NNAL [4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanol], iso-NNAL [4-(metilnitrosamino)-4-(3-piridil)-1-butanol] e iso-NNAC [4-(metilnitrosamino)-4-(3-piridil) ácido butírico] (IARC, 2007; Konstantinou et al., 2018).

No processo de classificação do tabaco seco os trabalhadores se expõem às TSNAs (Dalberto et al., 2023). Durante o processamento do tabaco seco ocorre a geração abundante de poeiras, que pode afetar o trato respiratório, podendo provocar alergias, de falta de ar, rinite etc., nos trabalhadores

ocupacionalmente expostos (Speziale et al., 1994; Uitti et al., 1998; Umadevi et al., 2003). Estudos demonstram que as TSNAs têm ações biológicas como carcinogenicidade, mutagenicidade, embriopatia e ações teratogênicas (Konstantinou et al., 2018), além disso, as nitrosaminas NNK e NNN, são classificadas no Grupo 1 como carcinógenos em humanos pelo IARC (*International Agency for Research on Cancer*) (IARC, 2007; Fisher et al., 2012; Kaiser et al., 2018).

Devido à dificuldade de se avaliar populações humanas expostas, existem outras maneiras de avaliar o potencial das substâncias em causar danos ao DNA, como o uso de linhagens celulares em testes *in vitro*. Os ensaios utilizando células são importantes na avaliação de determinados agentes, compostos ou substâncias químicas que podem afetar a proliferação celular ou então causar citotoxicidade (Riss et al., 2004; Matzenbacher et al., 2017). A linhagem celular de hepatocarcinoma humano (HepG2) é uma linhagem derivada do tecido hepático, sendo assim, sintetizam e secretam diversas proteínas características das células hepáticas humanas normais. A capacidade de metabolização faz com que essa linhagem seja amplamente utilizada em estudos para avaliar genotoxicidade e mutagenicidade (Knasmuller et al., 1998; Uhl et al., 2000).

O Ensaio Cometa é uma técnica amplamente utilizada para avaliar danos ao DNA tanto *in vitro* quanto *in vivo*. É um método sensível, rápido e confiável que permite a quantificação da genotoxicidade de diversas substâncias e condições ambientais. O ensaio é especialmente útil para avaliar o impacto de substâncias genotóxicas, permitindo a identificação precoce de potenciais riscos à saúde. Com isso, o ensaio Cometa tem se mostrado uma ferramenta valiosa para a identificação e avaliação de riscos genotóxicos associados à exposição ambiental e ocupacional, contribuindo para o desenvolvimento de políticas e medidas de prevenção e controle (Hartmann et al., 2003; Da Silva et al., 2003). Diante das diferentes problemáticas levantadas a respeito da cultura do tabaco, este trabalho avaliou os efeitos genotóxicos causados pelo extrato aquoso das folhas secas do tabaco na linhagem celular HepG2, e a genotoxicidade em amostras biológicas humanas de trabalhadores expostos ao tabaco seco durante o período de classificação das folhas secas.

Materiais e Método

Extrato aquoso

Para o extrato aquoso foi utilizado amostras de folhas secas coletadas em diferentes propriedades rurais nas cidades de Sobradinho e Santa Cruz do Sul (Rio Grande do Sul - RS; n=14). Foi gerado um *pool*,

a partir dessas amostras, com uma porção igual de cada propriedade (aproximadamente 200 g/propriedade). As amostras das folhas foram maceradas para a obtenção de um pó que foi utilizado para a preparação de um extrato aquoso. Para a realização do extrato aquoso, após macerado, 1g do pó foi misturado com 100 mL de água ultrapura e agitado em 250 rpm durante 24h a 25°C. Em seguida, a amostra foi sonicada com um ultra-som por 20 minutos para obtenção do extrato aquoso seguido de filtração com membrana estéril 0,22 µm (Dalberto et al., 2021).

Avaliação *in vitro*: Cultura celular HepG2

As células HepG2 adquiridas do banco de células do Rio de Janeiro (Brasil). Foram cultivadas sob condições padrões em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium High Glucose*) e suplementado com 20% de soro fetal bovino inativado (FBS), 0,1% de gentamicina e 1% de antibióticos penicilina/estrep-tomicina, em incubadora com atmosfera umidificada e temperatura constante de 37° C e 5% de dióxido de carbono (CO₂).

Para o teste, as células HepG2 (1 x 10⁵) foram semeadas em meio completo e cultivadas durante 24 horas em placas de 24 poços para permitir a aderência das células. Em cada um dos poços foram adicionadas três concentrações das amostras de extrato aquoso do tabaco (0,312 mg/mL, 1,25 mg/mL e 5 mg/mL), além do controle positivo (óxido de 4-nitroquinolina - 4NQO - 0,060 µM) e controle negativo (meio de cultura DMEM). As concentrações foram baseadas em estudos prévios (Dalberto et al., 2021; Scotti, 2021). Após 3 h de exposição, as células foram lavadas com DPBS (*Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline*), tripsinizadas e centrifugadas por 3 minutos a 1500 rpm. O sobrenadante foi retirado e as células foram ressuspensas com meio de cultura para preparo das lâminas para o Ensaio Cometa.

Avaliação *in vivo*: Biomonitoramento humano

As coletas ocorreram entre janeiro e março de 2020, nas mesmas cidades e propriedades das coletas das amostras das folhas secas. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da ULBRA (CAAE/CONEP 13898619.0.0000.5349). Participaram do estudo 38 indivíduos no grupo exposto durante a classificação do tabaco seco, sendo 20 homens e 18 mulheres. No grupo controle participaram 24 indivíduos, da mesma região do grupo exposto, mas que realizam atividades não influenciadas por agentes nocivos (atividades administrativas e comércio), sendo 8 homens e 16 mulheres. A média de idade dos homens e mulheres expostos foi de

42 e 45 anos, respectivamente. No grupo controle a média de idade foi de 32 anos pra os homens e de 33 anos para as mulheres. A média do tempo de exposição dos homens foi de 30 anos e das mulheres de 33 anos. Os indivíduos não eram fumantes e não consumiam bebida alcoólica.

Os indivíduos que participaram do estudo foram convidados a responder uma versão do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e uma versão em português adaptada do questionário da Comissão de Proteção Contra Mutágenos e Carcinógenos Ambientais (Carrano e Natarajan, 1988) e um questionário nutricional recordatório de horas (R24 h) (Willett e Lenart, 1998), contendo informações sobre seus padrões de estilo de vida. As amostras de sangue foram coletadas por profissional habilitado em tubos de coletas de sangue a vácuo contendo heparina (por punção venosa). As amostras foram armazenadas e transportadas sob temperatura controlada (4°C) até serem processadas no Laboratório de Genética Toxicológica da ULBRA.

Ensaio Cometa

A versão alcalina do Ensaio Cometa foi realizada conforme descrito por Singh et al. (1988) e Tice et al. (2000), segundo recomendações de Møller et al. (2020).

Para a linhagem HepG2, 20 µL de suspensão celular foi misturado com 80 µL de agarose de baixo ponto de fusão (1 %) e colocado sobre a lâmina com pré-cobertura de agarose (1,5 %) e sobre esta camada uma lamínula. Após a solidificação da mistura, as lâminas foram retiradas e as lâminas ficaram em cubetas contendo solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 10,0-10,5) acrescida de 1% (v/v) de Triton X-100 e 10% (v/v) de DMSO (dime-tilsulfóxido) à 4° C e protegida da luz, por 1 hora e 30 minutos. Após essa etapa, as lâminas foram colocadas em cubas de eletroforese e cobertas por solução tampão alcalina (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH>13), onde permaneceram por 20 minutos. Em seguida, foi realizada a eletroforese por 15 minutos a 25 volts (0,90 V/cm) e 300 mA. Após a eletroforese, as lâminas foram neutralizadas (Tris 0,4 M, pH 7,5) e coradas utilizando brometo de etídio. A visualização ocorreu em microscópio de fluorescência (Olympus com filtro de excitação 515–560 nm) utilizando o software *Comet Assay IV* (Perceptive instruments, Reino Unido). Um total de 100 células/cultura foram classificadas automaticamente conforme as proporções do DNA da cauda (intensidade de fluorescência refletida do DNA na cauda). O ensaio foi realizado em dois testes independentes.

Para as amostras de sangue humano, 5 µL de sangue foram misturadas com agarose de baixo ponto de

usão (1 %) e adicionadas em lâminas pré-cobertas com agarose (1,5%), adicionadas em tampão de lise e após submetidas à eletroforese (similar ao realizado com células HepG2). Posteriormente as lâminas foram coradas com nitrato de prata. Cem células por indivíduo foram contadas em microscópio óptico (Zeiss Primo Star). O cálculo do score visual seguiu as recomendações de Collins (2004). Para calcular o score visual (0-400), a avaliação considera um valor de dano a cada célula, distribuída em cinco classes (sem dano = 0 a dano máximo = 4) de acordo com o tamanho da cauda e forma.

Análise estatística

O teste t não pareado de Student foi utilizado para comparar os grupos (controle e exposto). O teste de correlação de Spearman foi realizado para avaliar a relação entre as variáveis independentes. Para a análise estatística do Ensaio Cometa na linhagem celular HepG2 foi utilizada a análise de variância (ANOVA), complementado por Dunnett's em dados log transformados. A análise estatística foi realizada usando o software GraphPad PRISM, versão 5.01 (GraphPad Inc., San Diego, CA).

Resultados e Discussão

A cultura do tabaco envolve diversas etapas, desde a plantação até a classificação das folhas secas. A produção do tabaco envolve a exposição do trabalhador a resquícios de agroquímicos, nicotina, TSNAs e outras substâncias presentes na folha, e com isso faz dessa cultura uma mistura complexa que pode ser prejudicial à saúde dos trabalhadores (Da Silva et al., 2013; Da Silva et al., 2014). Este estudo buscou avaliar os efeitos genotóxicos do extrato das folhas secas do tabaco tanto em células *in vitro*, bem como nos trabalhadores expostos ocupacionalmente às folhas secas (por manuseio).

Os resultados do Ensaio Cometa *in vitro* na linhagem HepG2 estão representados na Figura 1. Foi observado aumento significativo de danos ao DNA representado pela porcentagem de DNA na cauda, nas concentrações de 1,25 mg/mL e 5 mg/mL do extrato aquoso comparadas com o controle negativo. A linhagem HepG2 é muito utilizada por sua capacidade de metabolização, por possuir enzimas semelhantes às células hepáticas normais (Knasmuller et al., 1998; Uhl et al., 2000). O organismo humano precisa metabolizar diversas substâncias presentes no tabaco, como a nicotina e as nitrosaminas específicas do tabaco, a fim de que possam exercer seus efeitos sobre o corpo e serem excretadas. Essa metabolização ocorre no fígado por meio de enzimas da família do citocromo P450 (Sassone, 2015; Sarlak et al., 2020).

A genotoxicidade observada neste estudo nas células HepG2 pode ter sido causada por essas substâncias presentes na folha do tabaco, que podem ter reagido com o DNA causando os danos observados. Dalberto et al. (2021) avaliaram o extrato do tabaco em diferentes concentrações utilizando células fibroblásticas de pulmão de hamster chinês (V79). Neste estudo foram observados danos no DNA avaliados pelo Ensaio Cometa, e também pelo teste de micronúcleos, indicando a genotoxicidade e mutagenicidade do extrato do tabaco. Adicionalmente, no estudo de Dalberto et al. (2020), que avaliaram a nicotina e a cotinina (principal metabólito da nicotina) em células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y), foi observado aumento de danos ao DNA pelo Ensaio Cometa. Além disso, os autores realizaram a avaliação do ensaio cometa modificado com a enzima formamidopirimidina DNA glicosilase (FPG) que detecta purinas oxidadas, indicando a relação com mecanismos de desbalanço oxidativo (Azqueta et al., 2013).

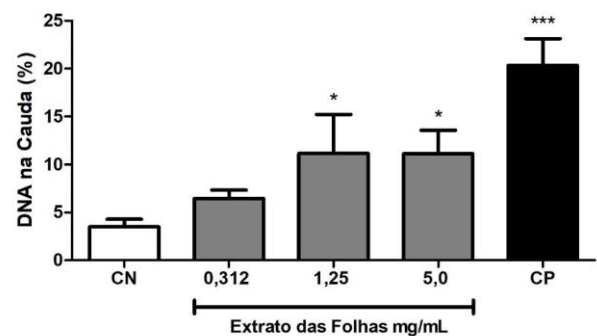


Figura 1: Ensaio cometa alcalino em HepG2 expostas à amostra de extrato das folhas secas do tabaco. CN: controle negativo; CP: controle positivo. Média ± desvio padrão. * significativo em $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$. Teste ANOVA/Dunnett's. Dados foram transformados em $Y = \log(Y)$.

Assim como observado na linhagem HepG2, o biomonitoramento dos trabalhadores apresentou resultados significativos para os grupos expostos quando comparados aos seus respectivos grupos controles, avaliados pelo Ensaio Cometa (Figura 2).

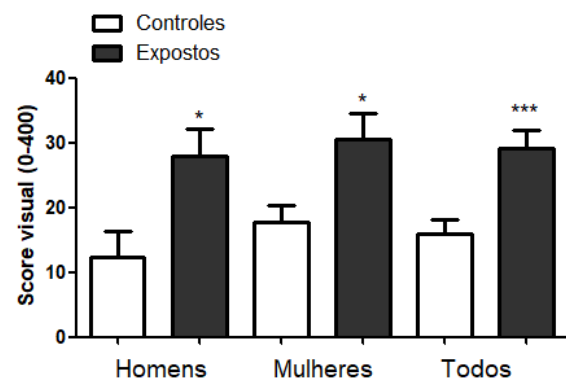


Figura 2: Score visual (0-400) avaliado através do Ensaio Cometa em células sanguíneas do grupo exposto comparado ao grupo

controle. Média \pm desvio padrão. *** Significativo em $p < 0,001$,
* Significante em $p < 0,05$; Teste t não pareado.

A genotoxicidade observada pode estar relacionada com a exposição à nicotina e com as TSNA's. Mesmo depois de seca, a folha do tabaco contém nicotina. Outros estudos demonstraram danos no DNA induzidos pela nicotina, aumento de danos no ensaio cometa, de aberrações cromossômicas e de MN (Argentin e Cicchetti, 2004; Arabi, 2004; Kleinsasser et al., 2005; Kahl et al., 2012; Ginzkey et al., 2013; Dalberto et al., 2023). As nitrosaminas contribuem para condições biológicas como carcinogenicidade, mutagenicidade, embriopatia e teratogenia, além disto, metabólitos de nitrosaminas podem gerar adutos de DNA (Sarlak et al., 2020). Segundo Xia et al. (2021), NNK e NNN são os principais contribuintes para a carcinogenicidade do tabaco, classificados pela IARC como Grupo I em humanos, indicando evidência de carcinogenicidade. NNN está relacionada com a indução de cânceres da cavidade oral, esôfago, cavidades nasais e trato respiratório em animais testados, e a exposição à NNK é considerada uma causa importante de câncer de pulmão em humanos (Caliri et al., 2021; Xia et al., 2021). Dalberto et al. (2023) demonstraram que trabalhadores expostos à folha seca do tabaco apresentaram aumento de nitratos no plasma. Níveis elevados de nitratos nos trabalhadores expostos ao tabaco seco pode ser indicativo de uma produção exagerada de óxido nítrico (NO) na presença de estresse oxidativo, que pode levar à formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), causando danos ao DNA, como disfunção de proteínas e células, prejudicando o sistema biológico e inibição da respiração mitocondrial (Di Stefano et al., 2020).

A falta do uso de equipamentos de proteção individual (EPIs) pode estar relacionada com o aumento dos danos encontrados neste estudo. Conforme relatos dos trabalhadores no momento da coleta, no período de separação do tabaco seco, eles não fazem uso EPIs. Estudos demonstram que a falta do uso de EPIs em produtores de tabaco pode estar relacionada com diversos graus de intoxicação avaliados por sintomas aparentes e índices alterados nos biomarcadores (Cargnin et al., 2017). Porém, na literatura os relatos sobre o uso de EPIs ocorrem principalmente durante a aplicação de pesticidas. Pouco se fala do uso de EPIs no momento de separação das folhas secas, momento em que ocorre a inalação de uma grande quantidade de poeira contendo os compostos presentes no tabaco. Fiori et al. (2015), descreveu que a inalação de grande quantidade de pó de tabaco causou danos à saúde e comprometeu a integridade do DNA de trabalhadores de processamento do tabaco. A poeira gerada durante o processamento do tabaco seco pode afetar

o trato respiratório, produz alergias, falta de ar, entre outros sintomas em trabalhadores expostos. Um estudo de caso-controle em Mangalore (Índia) relatou que a exposição ocupacional ao pó de tabaco (bidi) estava associada com o desenvolvimento do câncer de colo do útero (Joseph et al., 2016). Ainda, a frequência de morte associada ao linfoma não Hodgkin foi demonstrada em trabalhadores expostos ao tabaco em uma fábrica Italiana (Settimi et al., 1999). Um estudo com trabalhadores de tabaco seco na Tailândia demonstrou elevados índices de nicotina através da dosagem de nicotina salivar. Ficou evidente que os trabalhadores absorveram nicotina através do pó por exposição via dérmica e inalatória. Eles consideraram que uso indevido de EPI e o aumento dos níveis de nicotina salivar são fatores de risco para a saúde dos trabalhadores. O estudo indicou que a intoxicação causada pelo tabaco seco deveria ser considerada uma GTS (*Green Tobacco Sickness*; Doença do Tabaco Verde), visto que a manipulação do tabaco seco tem potencial para ser considerado uma doença ocupacional (Saleeon et al., 2016).

Foram realizadas correlações entre os parâmetros idade, score visual e tempo de exposição ao tabaco para o grupo dos trabalhadores expostos à folha seca (Figura 3). O tempo de exposição (em anos) apresentou correlação positiva e significativa em relação ao dano ao DNA. Os compostos presentes no tabaco geram radicais livres produzindo EROs que podem perturbar as vias celulares inibindo várias enzimas ou receptores, induzindo dano oxidativo no DNA, adutos de DNA e quebras de DNA de cadeia simples ou dupla (Kaur e Kaur, 2018; Cuenca et al., 2019; Pinto et al., 2020). A exposição aos compostos do tabaco leva a geração de danos no DNA, que se não forem reparados ou forem reparadas incorretamente, levam a mutações ou aberrações genômicas, ameaçando a viabilidade celular do organismo. As proteínas de reparo do DNA desempenham um papel crucial na correção dos danos genéticos. Estudos relataram danos citogenéticos em trabalhadores agrícolas, fumicultores, floricultores, cultivadores de vinhedos, trabalhadores do campo de algodão e outros expostos a diferentes tipos de pesticidas (Bolognesi et al., 2003; Kauer e Kauer, 2018; Alves et al., 2020; Dalberto et al., 2023).

Diferentes sistemas celulares expostos ao estresse oxidativo levam ao acúmulo de danos, instabilidade genômica e hipometilação do DNA (Bokhari e Sharma, 2019). Quando expostos a longo prazo, as células levam à resistência à apoptose, transformação neoplásica e desenvolvimento de tumor. Devido a isso, as EROs estimuladas por uma ampla variedade de compostos estão implicadas na patogênese e na toxicidade que levam a muitas doenças

humanas. Experimentos usando sistemas de modelo *in vivo* e *in vitro* sugerem que concentrações moderadamente mais altas de certas formas de EROs como óxido nítrico (NO) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) podem atuar como agentes de transdução de sinal (Barr et al., 2007).

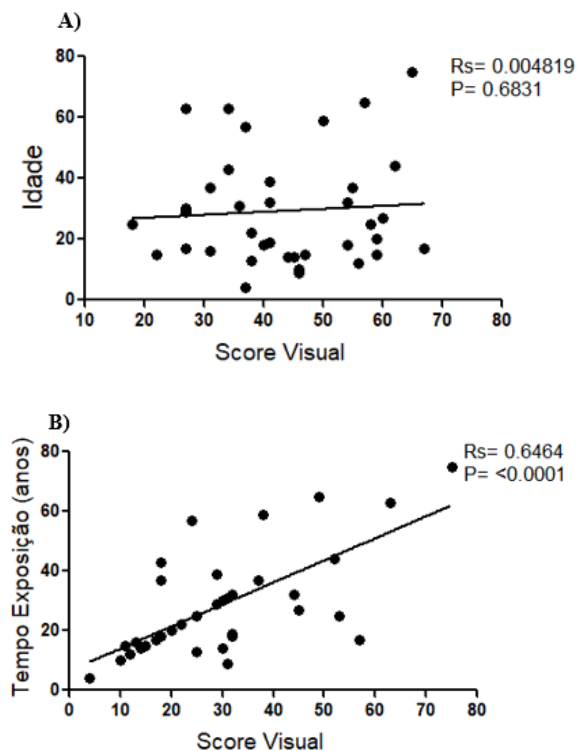


Figura 3: Análises não paramétricas de correlação de Spearman entre Idade versus Score visual (A), e Tempo de exposição (anos) versus Score visual (B).

Conclusões

Este estudo contribui para a compreensão dos riscos da exposição ao tabaco em trabalhadores da fumicultura na região sul do Brasil. Os dados apresentados corroboram outros resultados já existentes na literatura, de que os componentes nicotina e TSNAs presentes no tabaco causam danos ao DNA tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Os danos ao DNA encontrados em nosso estudo podem sugerir que os compostos do tabaco causam risco para a saúde dos trabalhadores expostos. Esses achados reforçam a necessidade de medidas preventivas para reduzir a exposição ao tabaco seco durante as atividades destes trabalhadores.

Agradecimentos

O desenvolvimento deste trabalho teve o apoio da Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), e agências

de fomento: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Referências

- ALKAM, T.; NABESHIMA, T. **Molecular mechanisms for nicotine intoxication.** *Neurochemistry International*, v. 125, p. 117-126, 2019.
- ALVES, J. S. *et al.* **Impact of nicotine-induced green tobacco sickness on DNA damage and the relation with symptoms and alterations of redox status in tobacco farmers.** *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 206, p. 111397, 2020.
- ARABI, M. **Nicotinic infertility: assessing DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa.** *Andrologia*, v. 36, p. 305-310, 2004.
- ARGENTIN, G.; CICHETTI, R. **Genotoxic and antiapoptotic effect of nicotine on human gingival fibroblasts.** *Toxicological Sciences*, v. 79, p. 75-81, 2004.
- AZQUETA, A.; ARBILLAGA, L.; CERTAIN, A. L.; COLLINS, A. **Enhancing the sensitivity of the comet assay as a genotoxicity test, by combining it with bacterial repair enzyme FPG.** *Mutagenesis*, v. 28, p. 271-277, 2013.
- BARR, J. *et al.* **Nicotine induces oxidative stress and activates nuclear transcription factor kappa B in rat mesencephalic cells.** *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 297, p. 93-99, 2007.
- BOLOGNESI, C. **Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies.** *Mutat Res*, v. 543, p. 251-272, 2003.
- BOKHARI, B.; SHARMA, S. **Stress marks on the genome: Use or lose?** *International Journal of Molecular Sciences*, v. 20, p. 364, 2019.
- CALIRI, A. W.; TOMMASI, S.; BESARATINIA, A. **Relationships among smoking, oxidative stress, inflammation, macromolecular damage, and cancer.** *Mutat Res*, v. 787, p. 108365, 2021.
- CARGNIN, M. C. S.; ECHER, E. C.; SILVA, D. R. **Tobacco farming: use of personal protective equipment and pesticide poisoning.** *Rev Fund Care Online*, v. 9, p. 466-472, 2017.
- CARRANO, A. V.; NATARAJAN, A. T. **Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques.** *Mutat Res*, v. 204, p. 379-406, 1988.

- CUENCA, J. B.; TIRADO, N.; BARRAL, J.; ALI, I.; LEVI, M.; STENIUS, U.; BERGLUND, M.; DREIJ, K. **Increased levels of genotoxic damage in a Bolivian agricultural population exposed to mixtures of pesticide.** *Sci Total Environ*, v. 695, p. 133942, 2019.
- DALBERTO, D.; GARCIA, A. L. H.; DE SOUZA, M. R.; PICININI, J.; SOARES, S.; DE SOUZA, G. M. S.; CHYTRY, P.; DIAS, J. F.; SALVADOR, M.; DA SILVA, F. R.; DA SILVA, J. **Dry tobacco leaves: an in vivo and in silico approach to the consequences of occupational exposure.** *Mutagenesis*, v. 4, n. gead003, 2023.
- DALBERTO, D.; NICOLAU, C. C.; ROSA DE SOUSA, M.; GARCIA, A. L. H.; BOARETTO, F.; PICADA, J. N.; DE SOUZA, G. M. S.; CHYTRY, P.; DIAS, J. F.; FEISTEL, C. C.; FERRAZ, A. B. F.; GRIVICICH, I.; DA SILVA, J. **Genotoxic effect induced by dried nicotiana tabacum leaves from tobacco barns (kiln-houses) in Chinese hamster lung fibroblast cells (V79).** *J Toxicol Environ Health A*, v. 84, n. 17, p. 689-701, 2 set. 2021.
- DALBERTO, D.; NICOLAU, C.; GARCIA, A.; NORDIN, A.; GRIVICICH, I.; DA SILVA, J. **Cytotoxic and genotoxic evaluation of cotinine using human neuroblastoma cells (SH-SY5Y).** *Genet Mol Biol*, v. 43, n. e20190123, 2020.
- DA SILVA, F. R.; KVITKO, K.; ROHR, P.; ABREU, M. B.; THIESEN, F. V.; DA SILVA, J. **Genotoxic assessment in tobacco farmers at different crop times.** *Sci Total Environ*, v. 15, p. 334-341, 2014.
- DA SILVA, F. R.; ERDTMANN, B.; DALPIAZ, T.; NUNES, E.; FERRAZ, A.; MARTINS, T. L.; SILVA, J. D. **Genotoxicity of Nicotiana tabacum leaves on Helix aspersa.** *Genet Mol Biol*, v. 36, p. 269-275, 2013.
- DA SILVA, J.; FONSECA, M. B. **Estudos Toxicológicos no Ambiente e na Saúde Humana.** In: SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. (org.). *Genética Toxicológica*. Porto Alegre, 2003. p. 70-84.
- DI STEFANO, A.; MANISCALCO, M.; BALBI, B.; RICCIARDOLO, F. L. M. **Oxidative and Nitrosative Stress in the Pathogenesis of Obstructive Lung Diseases of Increasing Severity.** *Curr Med Chem*, v. 27, p. 7149-7158, 2020.
- FIORI, N. S.; FASSA, A. G.; FARIA, N. M. X.; MEUCCI, R. D.; MIRANDA, V. I.; CHRISTIANI, D. C. **Wheezing in Tobacco Farm Workers in Southern Brazil.** *Am J Ind Med*, v. 58, p.1217-1228, 2015.
- FISHER, M. T. *et al.* **Sources of and technical approaches for the abatement of tobacco specific nitrosamine formation in moist smokeless tobacco products.** *Food Chem Toxicol*, v. 50, p. 942-948, 2012.
- GINZKEY, C. *et al.* **Assessment of nicotine-induced DNA damage in a genotoxicological test battery.** *Mutat Res*, v. 751, p. 34-39, 2013.
- HARTMANN, A.; AGURELL, E.; BEEVERS, C.; BRENDLER-SCHWAAB, S.; BURLINSON, B.; CLAY, P.; COLLINS, A.; SMITH, A.; SPEIT, G.; THYBAUD, V.; TICE, R. R. **4th International Comet Assay Workshop. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay.** *Mutagenesis*, [S.l.], v. 18, n. 1, p. 45-51, jan. 2003.
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER – IARC. **Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Smokeless Tobacco and Some Tobacco-specific N-Nitrosamines.** Volume 89. 2007.
- JOSEPH, N.; NELLIYANIL, M.; SUPRIYA, K.; BABU, Y. P. R.; NAIK, R.; PURUSHOTHAMA, K.; KOTIAN, S. M.; ANGELINE, R.; SHARAVATHI, K.; SARALAYA, V.; BHASKARAN, U.; JAIN, A. **Association between occupational history of exposure to tobacco dust and risk of carcinoma cervix: A case-control study.** *Indian J Cancer*, v. 53, p. 44-49, 2016.
- KAUR, K.; KAUR, R. **Occupational Pesticide Exposure, Impaired DNA Repair, and Diseases.** *Indian J Occup Environ Med, Mumbai*, v. 22, n. 2, p. 74-81, maio-ago. 2018.
- KAISER, S. *et al.* **Approaches for Estimating the Levels of Tobacco-Specific Nitrosamines in Cured Tobacco Samples.** *Chem Res Toxicol, Washington*, v. 31, p. 964-973, 2018.
- KAHL, V. F. S. *et al.* **Mitigation by vitamin C of the genotoxic effects of nicotine in mice, assessed by the comet assay and micronucleus induction.** *Mutat Res/Genet Toxicol Environ Mutagen, Amsterdam*, v. 744, p. 140-144, 2012.
- KLEINSASSER, N. H. *et al.* **The tobacco alkaloid nicotine demonstrates genotoxicity in human tonsillar tissue and lymphocytes.** *Toxicol Sci, Cary*, v. 86, p. 309-317, 2005.
- KONSTANTINOOU, A. *et al.* **Tobacco-specific nitrosamines: A literature review.** *Food Chem Toxicol, Oxford*, v. 118, p. 198-203, 2018.
- KNASMÜLLER, S. *et al.* **Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens.** *Mutat Res, Amsterdam*, v. 402, n. 1-2, p. 185-202, 1998.

- MATZENBACHER, C. A. *et al.* **DNA damage induced by coal dust, fly and bottom ash from coal combustion evaluated using the micronucleus test and comet assay in vitro.** *J Hazard Mater*, Amsterdam, v. 324, p. 781-88, 2017.
- MØLLER, P. *et al.* **Minimum Information for Reporting on the Comet Assay (MIRCA): recommendations for describing comet assay procedures and results.** *Nat Protoc*, [S.l.], v. 15, p. 3817-26, 2020.
- PINTO, B. G. S.; SOARES, T. K. M.; LINHARES, M. A.; GHISI, N. C. **Occupational exposure to pesticides: Genetic danger to farmworkers and manufacturing workers – A meta-analytical review.** *Sci Total Environ*, v. 748, p. 14138, 2020.
- RISS, T. L. *et al.* *Cell Viability Assays*. In: MARKOSIAN, S. *et al.* (Ed.). **Assay Guidance Manual [Internet]**. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004-. May 1, 2013 [atualizado em 1 jul. 2016].
- SALEEON, T.; SIRIWONG, W.; MALDONADO-PÉREZ, H. L.; ROBSON, M. G. **Salivary cotinine levels as a biomarker for Green Tobacco Sickness in dry tobacco production among traditional tobacco farmers.** *Rocz Panstw Zakl Hig*, v. 67, p. 121-30, 2016.
- SANTOS, E. S.; DEPONTI, C. M. **Tobacco production in Brazil: a study based on Douglass North's theory of location and regional growth.** *R Desenvolvimento Regional/Faccat*, v. 18, p. 1, 2021.
- SARLAK, S.; LALOU, C.; AMOEDO, N. D.; ROSSIGNOL, R. **Metabolic reprogramming by tobacco-specific nitrosamines (TSNAs) in cancer.** *Semin Cell Dev Biol*, v. 98, p. 154-66, 2020.
- SASSONE, A. H. **Estudio de las alteraciones bioquímicas, histopatológicas y ultraestructurales producidas por la administración oral a largo plazo de cotinina en ratas: Comparación con nicotina.** *Acta toxicol. argent.*, v. 19, p. 44-5, 2011.
- SCOTTI, Amanda Souza. **Avaliação da citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade do extrato aquoso da folha seca do tabaco utilizando células de hepatocarcinoma humano (HepG2).** 2021. 52 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde, Programa de Pós-graduação, Universidade Luterana do Brasil, Canoas, 2021.
- SETTIMI, L.; COSTELLATI, L.; NALDI, M.; BURSANI, G.; OLANOLA, S.; MAIOZZI, P. **A cohort study conducted to evaluate the mortality pattern among female and male workers in cigarette factory.** *Occup Med*, v. 49, p. 361-64, 1999.
- SINDICATO INTERESTADUAL DA INDÚSTRIA DO TABACCO, Sinditabaco. **Origem do tabaco.** Disponível em: <http://sinditabaco.com.br/sobre-o-setor/origem-do-tabaco/>. Acesso em: 10 abril, 2023.
- SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. **A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells.** *Exp Cell Res*. v. 175, p. 184-191, 1988.
- SPEZIALE, M.; FORNACIAI, G.; MONECHI, M. V. **Tobacco manufacture: environmental and health studies.** *Med Lav*. v. 85, p. 149-156, 1994.
- TICE, R. R. *et al.* **Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing.** *Environ Mol Mutagen*. v. 35, p. 206-221, 2000.
- UITTI, J. *et al.* **Respiratory health of cigar factory workers.** *Occup Environ Med*. v. 55, p. 834-839, 1998.
- UHL, M.; HELMA, C.; KNASMÜLLER, S. **Evaluation of the single cell gel electrophoresis assay with human hepatoma (Hep G2) cells.** *Mutat Res*. v. 468, n. 2, p. 213-225, Jul. 2000.
- UMADEVI, B. *et al.* **Cytogenetic effects in workers occupationally exposed to tobacco dust.** *Mutat Res/Genet Toxicol Environ Mutagen*. v. 535, p. 147-154, 2003.
- WILLETT, W.; LENART, E. **Reprodutibilidade e validade do questionário de frequência alimentar.** In: WILLETT, W.C. (Ed): *Epidemiologia Nutricional*, 2ª ed. Oxford: Oxford University Press, 1998, p. 514.
- XIA, B. *et al.* **Tobacco-Specific Nitrosamines (NNAL, NNN, NAT, and NAB) Exposures in the US Population Assessment of Tobacco and Health (PATH) Study Wave 1 (2013–2014).** *Nicotine Tob Res*. v. 23, p. 573-583, 2021.