



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE MEDICINA CLÍNICA**  
**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

**LUIZ IVANDO PIRES FERREIRA FILHO**

**GENES DO FUSO MITÓTICO E PONTO DE CHECAGEM MITÓTICO**  
**COMO BIOMARCADORES DA EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL A**  
**AGROTÓXICOS**

**FORTALEZA**

**2018**

LUIZ IVANDO PIRES FERREIRA FILHO

**GENES DO FUSO MITÓTICO E PONTO DE CHECAGEM MITÓTICO  
COMO BIOMARCADORES DA EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL A  
AGROTÓXICOS**

Tese apresentada ao Programa de Doutorado Acadêmico em Ciências Médicas, do Departamento de Medicina Clínica, na Faculdade de Medicina, na Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas.

Orientador: Prof. Dr. Ronald Feitosa Pinheiro

FORTALEZA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- F441g Ferreira Filho, Luiz Ivando Pires.  
GENES DO FUSO MITÓTICO E PONTO DE CHECAGEM MITÓTICO COMO BIOMARCADORES  
DA EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL A AGROTÓXICOS / Luiz Ivando Pires Ferreira Filho. – 2018.  
91 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação  
em Ciências Médicas, Fortaleza, 2018.  
Orientação: Prof. Dr. Ronald Feitosa Pinheiro.
1. Pesticidas; Ciclo celular; Carcinogênese; Medula Óssea. I. Título.

CDD 610

---

LUIZ IVANDO PIRES FERREIRA FILHO

**GENES DO FUSO MITÓTICO E PONTO DE CHECAGEM MITÓTICO  
COMO BIOMARCADORES DA EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL A  
AGROTÓXICOS**

Tese apresentada ao Programa de Doutorado Acadêmico em Ciências Médicas, do Departamento de Medicina Clínica, na Faculdade de Medicina, na Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas.

Aprovada em \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof Dr Ronald Feitosa Pinheiro (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará – UFC

---

Prof Dr Celso Arrais  
Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP

---

Profa Dra Sílvia Maria Meira Magalhães  
Universidade Federal do Ceará – UFC

---

Prof Dr Fernando Ferreira Carneiro  
Fundação Osvaldo Cruz – Fiocruz

---

Prof Dr Howard Lopes Ribeiro Júnior  
UNILAB

## RESUMO

Os pesticidas são produtos químicos de uso indiscriminado no Brasil para o controle das pragas nas lavouras agrícolas. Estes produtos são classificados em herbicidas, inseticidas e fungicidas e podem acumular-se no meio ambiente. Um grande número de estudos epidemiológicos em trabalhadores rurais sugeriu uma forte associação com o aumento do risco de câncer no grupo exposto a esses compostos pelas suas propriedades genotóxicas. Genes relacionados aos mecanismos de regulação do ciclo celular (*CDKN1A*), ponto de checagem mitótico (*MAD2* e *CDC20*) e fuso mitótico (*AURKA*, *AURKB*) estão diretamente relacionadas com a estabilidade cromossômica e o desenvolvimento de neoplasias. O objetivo deste estudo é avaliar os níveis de expressão desses genes em trabalhadores rurais expostos a pesticidas. Este é o primeiro estudo a avaliar estas alterações utilizando células da medula óssea coletadas por aspirado medular de trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos. A análise de expressão gênica foi realizada utilizando-se a metodologia de PCR em tempo real, a partir de amostras de medula óssea de 95 trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos, divididos em três grupos: grandes produtores, agricultura familiar e agricultura ecológica. Após a análise da expressão gênica, identificamos que: agricultores com 21 a 30 anos de exposição a agrotóxicos apresentam um aumento de expressão do gene *AURKA* quando comparados a agricultores expostos entre 1 a 10 anos a agrotóxicos ( $p=0.041$ ); o gene *AURKB* está com expressão diminuída em agricultores que utilizaram herbicida frente aos indivíduos que não utilizaram ( $p=0.049$ ); agricultores que possuem exposição direta ao agrotóxico apresentam, também, uma diminuição da expressão de *AURKB* quando comparados a agricultores com exposição indireta aos agrotóxicos ( $p=0.002$ ); agricultores grandes produtores ( $p<0.000$ ) e de cultivo familiar ( $p<0.000$ ) (ambos utilizam agrotóxicos nas colheitas) apresentam um aumento de expressão de *MAD2* quando comparados a agricultores de cultivo ecológico ( $p=0.049$ ); agricultores de cultivo ecológico apresentam um aumento de expressão do gene *CDKN1A* quando comparados a indivíduos de grande produção ( $p<0.000$ ) e agricultura familiar ( $p<0.000$ ). Através desse estudo hipotetizamos que os genes *CDC20* e *CDKN1A* podem corresponder a novos marcadores moleculares para a exposição ocupacional crônica a agrotóxicos e demonstramos que os genes relacionados ao controle do ciclo celular possuem expressão descontrolada em indivíduos expostos a agrotóxicos. Estes resultados suportam a importância dos genes *AURKA*, *AURKB*, *MAD2*, *CDC20* e *CDKN1A* na manutenção da estabilidade genômica das células tronco hematopoiéticas e podem estar envolvidos no processo de carcinogênese na população estudada.

**Palavras-chaves:** Pesticidas; Ciclo celular; Carcinogênese; Medula Óssea

## ABSTRACT

Pesticides are chemicals used indiscriminately in Brazil to control pests in agricultural crops. These products are classified into herbicides, insecticides and fungicides and can accumulate in the environment. A large number of epidemiological studies in rural workers have suggested a strong association with the increased risk of cancer in the group exposed to these compounds due to their genotoxic properties. Genes related to cell cycle regulation mechanisms (CDKN1A), mitotic checkpoint (MAD2 and CDC20) and mitotic spindle (AURKA, AURKB) are directly related to chromosomal stability and the development of neoplasms. The aim of this study is to evaluate the levels of expression of these genes in rural workers exposed to pesticides. This is the first study to assess these changes using bone marrow cells collected by spinal cord aspiration from rural workers exposed to pesticides. The analysis of gene expression was performed using the real-time PCR methodology, using bone marrow samples from 95 rural workers exposed to pesticides, divided into three groups: large producers, family farming and ecological farming. After analyzing gene expression, we identified that: farmers with 21 to 30 years of exposure to pesticides show an increase in expression of the AURKA gene when compared to farmers exposed between 1 to 10 years to pesticides ( $p = 0.041$ ); the AURKB gene had reduced expression in farmers who used herbicide compared to individuals who did not ( $p = 0.049$ ); farmers who have direct exposure to pesticides also show a decrease in the expression of AURKB when compared to farmers with indirect exposure to pesticides ( $p = 0.002$ ); big farmers ( $p < 0.000$ ) and family farmers ( $p < 0.000$ ) (both use pesticides in their crops) showed MAD2 expression increased when compared to ecologically grown farmers ( $p = 0.049$ ); Ecologically cultivated farmers showed increased expression of CDKN1A gene when compared to individuals with high production ( $p < 0.000$ ) and family farming ( $p < 0.000$ ). Through this study we hypothesized that the CDC20 and CDKN1A genes may correspond to new molecular markers for chronic occupational exposure to pesticides and we demonstrate that the genes related to the control of the cell cycle have uncontrolled expression in individuals exposed to pesticides. These results support the importance of the AURKA, AURKB, MAD2, CDC20 and CDKN1A genes to maintain the genomic stability of hematopoietic stem cells and may be involved in the process of carcinogenesis in the studied population.

**Key-words:** Pesticides, Cycle cell; Carcinogenesis; Haematopoetic cells

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Ilustração da ação do carcinógeno no DNA da célula após absorção e metabolismo	<b>11</b>
<b>Figura 2:</b> Mecanismos de perda de heterozigose e inativação de gene tipo selvagem	<b>12</b>
<b>Figura 3:</b> Esquema da ação do gene TP53 como indutor de apoptose e prevenção do surgimento de neoplasias	<b>14</b>
<b>Figura 4:</b> Modelo de carcinogênese pela via das aneuploidias	<b>15</b>
<b>Figura 5:</b> Represa que abastece o perímetro irrigado e a comunidade na Chapada do Apodi	<b>18</b>
<b>Figura 6:</b> Ilustração dos mecanismos para transformação para leucemia após exposição ao benzeno	<b>25</b>
<b>Figura 7:</b> Ilustração da transição da fase de metáfase para anáfase	<b>26</b>
<b>Figura 8:</b> Caso 12 revela deleção do braço longo do cromossomo 11	<b>44</b>
<b>Figura 9:</b> Caso 32 revela deleção do braço longo do cromossomo 7	<b>45</b>
<b>Figura 10:</b> Caso 13 revela deleção do braço longo do cromossomo 11	<b>45</b>
<b>Figura 11:</b> Caso 2 revela hipodiploidia	<b>46</b>
<b>Figura 12:</b> Nível de expressão do gene <i>CDC20</i> em relação aos grupos de exposição	<b>47</b>
<b>Figura 13:</b> Nível de expressão do gene <i>CDC20</i> em relação ao tipo de exposição	<b>47</b>
<b>Figura 14:</b> Nível de expressão do gene <i>CDC20</i> em relação ao uso do paraquat	<b>48</b>
<b>Figura 15:</b> Nível de expressão do gene <i>CDC20</i> em relação ao uso de organofosforado	<b>48</b>
<b>Figura 16:</b> Nível de expressão do gene <i>CDKN1A</i> em relação aos grupos de exposição	<b>49</b>
<b>Figura 17:</b> Nível de expressão do gene <i>CDKN1A</i> em relação ao tipo de exposição	<b>49</b>
<b>Figura 18:</b> Nível de expressão do gene <i>CDKN1A</i> em relação ao uso do paraquat	<b>50</b>

<b>Figura 19:</b> Nível de expressão do gene <i>CDKN1A</i> em relação ao uso de organofosforados	<b>50</b>
<b>Figura 20:</b> Nível de expressão do gene <i>AURKA</i> em relação ao uso de herbicidas	<b>51</b>
<b>Figura 21:</b> Nível de expressão do gene <i>AURKA</i> em relação ao tempo de exposição a agrotóxicos	<b>51</b>
<b>Figura 22:</b> Nível de expressão do gene <i>AURKB</i> em relação ao uso de herbicidas	<b>52</b>
<b>Figura 23:</b> Nível de expressão do gene <i>AURKB</i> em relação ao tipo de exposição	<b>53</b>
<b>Figura 24:</b> Nível de expressão do gene <i>MAD2</i> em relação ao tabagismo	<b>53</b>
<b>Figura 25:</b> Análise da correlação dos níveis de expressão dos genes <i>AURKA</i> , <i>AURKB</i> , <i>MAD2</i> , <i>CDC20</i> e <i>CDKN1A</i>	<b>56</b>
<b>Figura 26:</b> Análise da correlação dos níveis de expressão dos genes <i>MAD2</i> e <i>AURKB</i>	<b>57</b>
<b>Figura 27:</b> Análise da correlação dos níveis de expressão dos genes <i>AURKA</i> e <i>AURKB</i>	<b>58</b>
<b>Figura 28:</b> Análise da correlação dos níveis de expressão dos genes <i>CDC20</i> e <i>AURKB</i>	<b>59</b>
<b>Figura 29:</b> Análise da correlação dos níveis de expressão dos genes <i>CDC20</i> e <i>MAD2</i>	<b>60</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Classificação dos agrotóxicos segundo os efeitos à saúde humana.	<b>15</b>
<b>Tabela 2:</b> Características clínicas e sócio-demográficas dos agricultores.	<b>38</b>
<b>Tabela 3:</b> Caracterização dos agricultores pelo resultado citogenético.	<b>39</b>
<b>Tabela 4:</b> Expressão dos genes <i>AURKA</i> , <i>AURKB</i> , <i>MAD2</i> , <i>CDC20</i> e <i>CDKN1A</i> em amostras de medula óssea de agricultores	<b>50</b>

## LISTA DE QUADROS

**Quadro 1:** Lista de agrotóxicos utilizados na monocultura da banana de acordo com a praga a ser combatida e classificação por grupo químico e classe toxicológica **13**

**Quadro 2:** Lista de estudos epidemiológicos que estabeleceram forte associação entre a exposição crônica a agrotóxicos e o desenvolvimento de câncer **20**

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	
1.1	Carcinogênese	10
1.2	Agrotóxicos como problema de saúde pública	16
1.3	Pesticidas utilizados na região estudada	18
1.4	Correlação entre pesticidas e neoplasias	22
1.5	Correlação entre carcinogênese e o controle do ciclo celular e fuso mitótico	25
1.5.1	Controle e regulação do ciclo celular	23
1.5.2	Genes relacionados ao ponto de checagem mitótico	24
1.5.3	Genes relacionados ao fuso mitótico	25
1.5.4	Genes reguladores do ciclo celular	27
1.6	Vigilância à saúde do trabalhador	28
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	
2.1	Objetivo geral	33
2.2	Objetivos específicos	33
<b>3</b>	<b>SUJEITOS, MATERIAL E MÉTODO</b>	
3.1	Tipo de estudo	34
3.2	População do estudo	34
3.3	Aspectos éticos	34
3.4	Coleta de dados	35
3.5	Análise Laboratorial	35
3.6	Coleta das amostras de medula óssea	35
3.7	Cariótipo por Banda G	36

3.8	qPCR ( PCR quantitativa em tempo real)	36
3.9	Análise estatística	40
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	42
4.1	Caracterização da população estudada	42
4.2	Análise citogenética em amostras de medula óssea	44
4.3	Análise de expressão gênica em pool celular por qPCR	47
4.3.1	Análise do nível de expressão do gene <i>CDC20</i>	47
4.3.2	Análise do nível de expressão do gene <i>CDKN1A</i>	49
4.3.3	Análise do nível de expressão do gene <i>AURKA</i>	52
4.3.4	Análise do nível de expressão do gene <i>AURKB</i>	52
4.3.5	Análise do nível de expressão do gene <i>MAD2</i>	54
4.4	Análise de correlação entre os níveis de expressão dos genes relacionados ao fuso mitótico e ponto de checagem mitótica	56
<b>5</b>	<b>REFERÊNCIAS</b>	69
<b>6</b>	<b>APÊNDICES</b>	80

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 – Carcinogênese

A célebre citação de Hananah e Weinberg de que o câncer é uma doença genética cada vez mais se consolida e recebe embasamento à medida em que se evidencia a expressão descontrolada de genes nos tecidos neoplásicos. De acordo com esses autores, as marcas características do câncer são o resultado das propriedades adquiridas pelas células cancerosas após alterações genéticas provocadas por agentes indutores de neoplasias (HANANAH & WEIBERG, 2011).

Acredita-se que as alterações genéticas encontradas nas células tumorais são provocadas pela exposição crescente do homem a agentes químicos, físicos e/ou biológicos, potencialmente mutagênicos e/ou carcinogênicos que explicaria a incidência elevada de neoplasias, pelo menos em grupos selecionados de indivíduos (BRUSICK, 2016; TARAZONA, 2017).

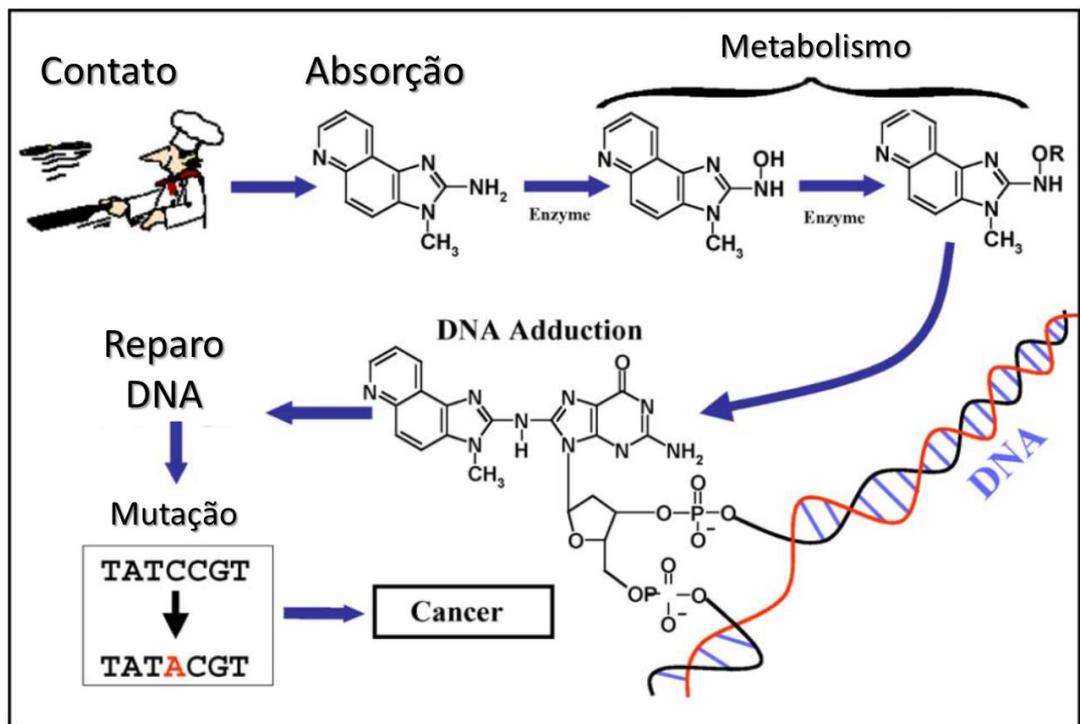
Alguns modelos de evolução tumoral conseguiram comprovar a ocorrência de uma alteração genética para cada etapa de transformação neoplásica, como é o caso do câncer colorretal, em que cada fase de evolução corresponde a uma deleção de uma região cromossômica ou a uma mutação ou perda de função de um gene específico (FEARON, 1990; SCARPA, 2014).

Vários estudos têm mostrado que os produtos que possuem a capacidade de alterar os alvos ou vias de sinalização das células incluídas entre as marcas características do câncer são provavelmente cancerígenos (HANANAH & WEIBERG, 2011). Entre as principais características dos carcinógenos estão: o fato de serem eletrofílicos ou poderem ser ativados metabolicamente; a capacidade genotóxica; a capacidade de alterar o reparo do DNA ou causar instabilidade genômica; induzir alterações epigenéticas; induzir o estresse oxidativo; induzir inflamação crônica; provocar imunossupressão; modular os efeitos mediados por receptores; inibir a senescência e aumentar a proliferação celular (SMITH, 2016).

Os agentes mais estudados são os agentes químicos carcinógenos que podem ser divididos em genotóxicos e não genotóxicos. Os primeiros são capazes de alterar quantitativa ou qualitativamente o genoma celular, ao passo que os últimos não interagem com o DNA, mas modulam o crescimento e a apoptose celular, potencializando o efeito genotóxico (GREIM, 2015). Esses compostos, em altas doses, podem causar proliferação celular e quebras de fitas simples ou duplas do DNA (HOEIJMAKERS, 2009; GUYTON, 2015).

Normalmente, os efeitos carcinogênicos desses agentes são minimizados pela ação de enzimas da família do Citocromo P450 que atuam no processo de oxidação/ativação (fase I) e conjugação/detoxificação (fase II) desses compostos (REED, 2018). A inativação de xenobióticos facilita a excreção e eliminação do organismo, preservando a integridade celular (RAVEGNINI, 2015).

Após ultrapassarem a membrana da célula, são metabolizados em compostos eletrofílicos que penetram no núcleo e interagem com o material genético, ocasionando alterações estruturais e instabilidade genômica (Figura 1). Esta é chamada fase de iniciação, e constitui o primeiro passo para a carcinogênese (REED, 2018).



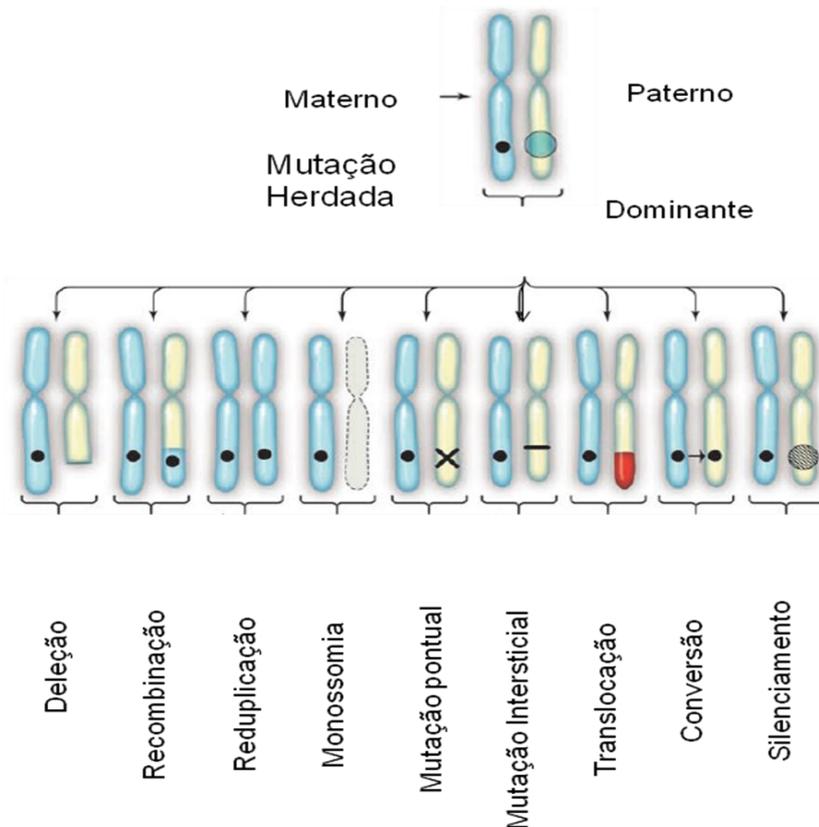
**Figura 1** – Ilustração da ação do carcinógeno no DNA da célula após absorção e metabolismo

Os danos ao material genético provocados pelos agentes genotóxicos levam a ocorrência de mutações e a uma instabilidade genômica (CÁRCER, 2014). As mutações podem ser classificadas em gênicas, cromossômicas ou genômicas, de acordo com a localização em que ocorrem ou com o envolvimento do genoma. São chamadas mutações pontuais ou gênicas quando afetam a sequência de nucleotídeos de um determinado gene. As mutações cromossômicas, tais como deleções, inserções, translocações, ampliações, afetam

sequências de nucleotídeos que envolvem um grande número de genes. Quando as alterações envolvem a duplicação ou deleção de uma sequência de nucleotídeos de um cromossomo inteiro, são chamadas de mutações genômicas e levam ao aparecimento de aneuploidias, poliploidias ou a formação de um micronúcleo que contém um centrômero (SMITH, 2016).

A maior parte destas alterações pode ser observada sob a forma de alterações citogenéticas ou alterações numéricas dos cromossomos destas células (PANNUNZIO, 2018). Como resultado subsequente, a maior consequência dessas alterações é a perda ou alteração da expressão de genes localizados nos segmentos cromossômicos afetados, resultando na perda de função das proteínas codificadas por estes genes (RAVEGNINI, 2015).

Na figura abaixo podem ser observados os diferentes tipos de mutações que podem interferir na função de um determinado gene e conseqüentemente da proteína codificada por ele. Neste exemplo, o primeiro passo para a carcinogênese possui característica herdada e o segundo passo seria a ocorrência de uma mutação no seu alelo dominante. Esse mecanismo é chamado de perda da heterozigose e pode explicar a transmissão familiar da predisposição a determinados tipos de câncer (FOULKES, 2008).



Adaptado de Foulkes, 2008 – N Engl J Med 2008;359:2143-53

**Figura 1** - Mecanismos de perda de heterozigose e inativação de gene tipo selvagem.

A carcinogênese é um processo que necessita de múltiplas etapas até que a célula adquira uma proliferação anormal. As lesões ao material genético representam um processo importante e constituem o primeiro passo para a transformação neoplásica. Alguns mecanismos de alterações genéticas que participam no processo de carcinogênese têm sido descritas nos tumores sólidos (HANANAH & WEINBERG, 2011). No câncer colorretal, por exemplo, a mutação do gene *APC* (localizado no braço longo do cromossomo 5) levaria à transição de um epitélio normal para um epitélio hiperproliferativo ou adenoma precoce. Em seguida, uma mutação no gene *K-RAS* (situado no braço curto do cromossomo 12) levaria à evolução para um adenoma intermediário. Na sequência, uma mutação no gene *DCC* (localizado no braço longo do cromossomo 18) levaria à formação de um adenoma tardio. Por fim, a mutação do gene *TP53* (posicionado no braço curto do cromossomo 17) levaria à transformação para um carcinoma in situ (BARRET, 1993; SACARPA, 2014).

O desenvolvimento de uma neoplasia ocorre quando o dano na estrutura do DNA da célula se torna irreversível e, além disso, ocorre proliferação das células transformadas, esta é chamada fase de promoção (HANAHAN & WEINBERG, 2011). O conceito de iniciação e promoção é baseado em estudos para o desenvolvimento de câncer em modelos experimentais.

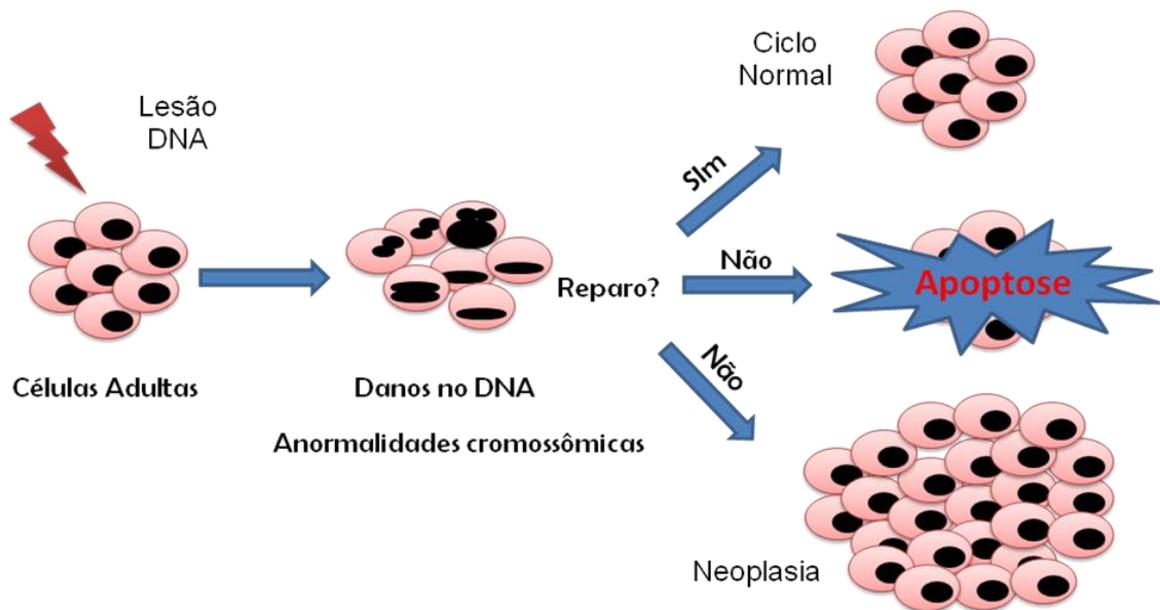
No tecido hematopoético, as evidências demonstram que a massa tumoral origina-se de uma única célula que contraiu as alterações genéticas, conhecido como clone tumoral. Esses clones surgem após um processo seletivo local que leva a uma expansão clonal das células dotadas de maior capacidade proliferativa (BIECHONSKI, 2017). A expansão clonal das células alteradas representa o fenômeno mais importante do processo de carcinogênese (LÓPEZ-LÁZARO, 2018).

A Leucemia Mielóide Crônica é um tipo de tumor que reforça esta teoria, pois em quase todos os casos as células leucêmicas têm o mesmo tipo de translocação entre os cromossomos 9 e 22 (Cromossomo Philadelphia) (SWERDLOW, 2016). Esta translocação promove a formação de um gene híbrido, o *BCR-ABL*, responsável pelo status de ativação permanente da proliferação de células de linhagem mielóide, resultando numa síndrome mieloproliferativa no tecido hematopoético (ENAN, 2015).

O mesmo padrão é observado em neoplasias de linfócitos B (Linfomas Não-Hodgkin), em que todas as células do tumor possuem o mesmo tipo de rearranjo no gene que codifica a cadeia das imunoglobulinas (GAUDUCHON, 2004). A translocação entre os cromossomos 14 e 18 é uma das mais encontradas nos Linfomas Não-Hodgkin e ocorre em 70-90% dos casos de Linfoma Folicular, 20-30% dos Linfomas Difusos de Grandes Células e em 5-10%

dos outros subtipos menos comuns. Essa translocação envolve duas regiões gênicas específicas, a região 14q32, locus da cadeia pesada da imunoglobulina (IgH) e a região 18q21, locus do gene *BCL2*, um indutor natural de apoptose (SWERDLOW, 2016). O processo de translocação entre essas regiões gênicas resulta no aumento da expressão do gene *BCL2*, e consequentemente, no aumento da função antiapoptótica da proteína BCL2, levando ao aumento da sobrevivência da célula, o que representa um passo inicial no processo maligno da linfomagenese (STAUDT, 2007).

Quando as mutações ocorrem em proto-oncogenes ou genes supressores tumorais, estes genes deixam de exercer o seu papel de defesa, ocorrendo várias alterações na célula que se traduzem na expressão de proteínas anômalas e falha no controle do ciclo celular (PANNUNZIO, 2018). O maior exemplo disso é o que ocorre na mutação do gene TP53, o gene supressor tumoral mais mutado em todas as neoplasias (JAIN, 2018). Esse tipo de mutação pode resultar na hiperexpressão de oncogenes e provocar uma proliferação celular descontrolada, a chamada fase de transformação neoplásica (Figura 3) (HANAHAN & WEINBERG, 2011).



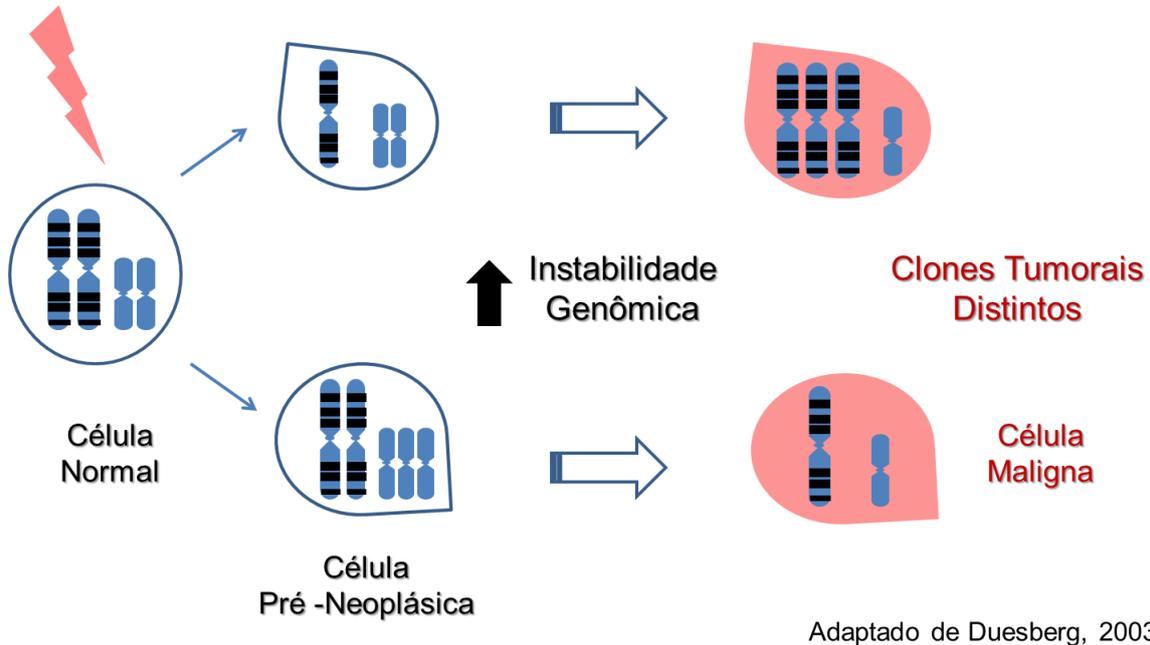
**Figura 3:** Esquema da ação do gene TP53 como indutor de apoptose e prevenção do surgimento de neoplasias.

Outro modelo de carcinogênese proposto por Duesberg é o modelo pela via das aneuploidias. De acordo com esse modelo, uma mutação em genes que regulam o ciclo

celular pode levar a uma segregação incorreta das cromátides irmãs durante o processo de divisão celular e ocorrer a formação de uma célula filha aneuplóide pré neoplásica.

Cada vez que uma célula se divide, seu conteúdo cromossômico deve ser igualmente segregado nas duas células filhas. Este processo crítico é mediado por um complexo aparelho formado por microtúbulos e chamado de fuso mitótico. Na maioria das células animais, os centrôssomos contribuem para a formação e a função adequada do fuso mitótico ancorando e nucleando os microtúbulos e estabelecendo sua organização bipolar (VITRE, 2012). A expressão aberrante de proteínas envolvidas na biogênese do centrôssomo pode levar à disfunção do centrôssomo ou a um número de centrôssomos anormais, levando, em última instância, à formação de fusos defeituosos e falha na segregação dos cromossomos, e consequentemente aneuploidias (CAHILL, 1998).

As aneuploidias promovem um aumento da instabilidade genômica na célula suficiente para alterar a expressão de oncogenes e genes supressores tumorais. O aumento da instabilidade genômica após sucessivas divisões celulares levaria à expansão de clones tumorais aneuplóides (COSENZA, 2015) (Figura 4).



**Figura 4** – Modelo da Carcinogênese pela via das aneuploidias. As barras verticais com bandas são os cromossomos das células, as células no formato de gota representam erro no processo de segregação das cromátides irmãs em que houve separação incorreta (não diplóide) dos cromossomos durante a divisão celular.

Vale ressaltar que em torno de 90% dos tumores sólidos humanos e a maioria das neoplasias hematopoéticas são aneuplóides. Diante disso, percebe-se que a formação de clones aneuplóides é uma etapa crucial no processo da carcinogênese (VITRE, 2012).

## **1.2 Agrotóxicos como problema de saúde pública**

A saúde de uma população mantém estreita relação com as alterações provocadas ao meio ambiente pelo homem e com os resíduos gerados nesse processo. Estes resíduos podem ser de natureza sólida ou até mesmo contaminantes químicos potencialmente tóxicos para os seres vivos com capacidade de se propagar pelo solo e pela água. Uma das grandes preocupações atuais é o uso indiscriminado de agrotóxicos na agricultura brasileira (AUGUSTO, 2012). A aplicação de agrotóxicos é, provavelmente, a única atividade em que a contaminação do ambiente de trabalho é realizada de forma intencional (MACHADO, 2007). Esse quadro se agrava à medida que o país passa da condição de subsistência à de principal exportador de derivados agrícolas, quando a economia é fortalecida pela indústria do agronegócio (IBGE, 2009).

Dentre os agravos à saúde relacionados ao processo produtivo rural, os de maior relevância e impacto negativo para a saúde humana e ambiental são as contaminações e intoxicações relacionadas aos agrotóxicos (PIGNATI, 2007). Segundo a Lei Federal nº7. 802 de 11/07/1989 (BRASIL, 1989), agrotóxicos são:

Produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento.

Dados da ANVISA registram que em 2008 o Brasil se tornou o maior consumidor mundial de agrotóxicos, ultrapassando o mercado dos Estados Unidos. No mesmo ano, o governo brasileiro instituiu o plano integrado de vigilância em saúde de populações expostas a agrotóxicos (BRASIL, 2009), devido à repercussão no âmbito da saúde dos trabalhadores e das comunidades que vivem próximas às áreas produtivas. Esse plano visava combater o uso abusivo de substâncias tóxicas na agricultura, muitas delas já proibidas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, na tentativa de prevenir o agravo à saúde das pessoas envolvidas nesse processo. Assim como as ações e atividades do setor saúde relacionadas aos

agrotóxicos, a magnitude das intoxicações por agrotóxicos também não está claramente estabelecida no Brasil (BUENO, 2009).

Segundo dados do Censo Agropecuário de 2006, o Ceará é o quarto estado do Brasil em número de estabelecimentos que usam agrotóxicos, ficando atrás apenas dos estados da Bahia, Minas Gerais e Rio Grande do Sul (IBGE, 2006). Apesar da legislação prever a contagem a cada cinco anos, este foi o último censo agropecuário realizado no Brasil, segundo o governo, por falta de orçamento. Desde outubro de 2017, existe a iniciativa de um novo censo, que até o momento da apresentação desta tese não foi finalizado (IBGE, 2017).

No Estado do Ceará, a 200 km de Fortaleza está localizada a Chapada do Apodi, que compreende uma área de 2.421,8 km<sup>2</sup> e engloba os municípios de Aracati, Jaguaruana, Quixeré, Limoeiro do Norte, Tabuleiro do Norte, Alto Santo e Potiretama.

De acordo com levantamento do censo Agropecuário de 2006, os municípios da região da Chapada do Apodi estão entre os que possuem maior número de estabelecimentos agrícolas que utilizam agrotóxico no Brasil.

Nesta região estão instaladas empresas nacionais e multinacionais produtoras de frutas em regime de monocultura desde o ano 2000. A região se destaca pelo agronegócio da banana, que utiliza as terras férteis do perímetro irrigado da chapada e a mão de obra dos pequenos produtores locais. Essas empresas realizam pulverização de agrotóxicos nas lavouras em larga escala tanto com o auxílio de tratores como de aviões (RIGOTTO, 2011).

A expansão do agronegócio caracteriza-se por transformações nas condições de trabalho e no meio ambiente. Os pequenos agricultores que faziam uso sazonal de uma grande variedade de agrotóxicos em suas culturas de subsistência passam a ser empregados do agronegócio. A partir desse momento, começam a trabalhar na monocultura da banana e entram em contato contínuo com o elevado número de produtos químicos utilizados. Além disso, os trabalhadores frequentemente estão expostos a uma nuvem tóxica sempre que adentram as plantações, tornando a exposição diária e constante (RIGOTTO, 2010).

Segundo os Estudos de Impacto Ambiental - EIA, realizados na região, entre os impactos apontados, podemos mencionar as agressões que ocorrem nas reservas hídricas, ocasionadas pelo escoamento de águas contaminadas por agrotóxicos, produtos químicos diversos e fertilizantes para as camadas mais profundas, inclusive o lençol freático.

Um grande aquífero chamado Jandaíra está localizado sob parte do Ceará e do Rio Grande do Norte. Nos dois estados, a região que cobre o aquífero tem sido ocupada por empresas de fruticultura e perfurada para a extração de água para irrigação (LONDRES, 2011). São poços artesianos profundos, alguns com mais de 100 metros de profundidade. A

Companhia de Gestão dos Recursos Hídricos do Ceará resolveu monitorar a água desses poços e escolheu dez deles para coletar amostras para análise de resíduos de agrotóxicos, tendo encontrado produtos químicos agrícolas em 6 deles (LONDRES, 2011).



**Figura 5:** Represa que abastece o perímetro irrigado e a comunidade na Chapada do Apodi.  
Fonte: [www.uol.com.br/uolnoticias](http://www.uol.com.br/uolnoticias).

Um estudo da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará- UFC, após análise de 46 amostras de água da região, constatou a presença de 22 princípios ativos de agrotóxicos na água consumida pela comunidade, o que faz dessa água uma ameaça à saúde de todos que a ingerem (LONDRES, 2011). Dentre os produtos químicos encontrados na água das torneiras podemos citar: Abamectina, Carbofurano, Fosetil, Procimidona, Endosulfan, Ciromazina, Deltametrina, Epoxiconazol, Glifosato, Procloraz, Cletodim, Difenoconazol, Azoxistrobina, Fenitrotona, Imidacloprido, Flumioxazina, Tebuconazol, Epraloxidim, Carbaril, Epoxiconazol, Piraclostrobina e Clorpirifós (Rigotto et al., 2010).

### **1.3 – Pesticidas utilizados na região estudada**

Os trabalhadores do agronegócio são os que estão expostos a quantidades mais elevadas de agrotóxicos e de forma constante. O contato ocorre quase todos os dias, seja durante a pulverização ou durante o trabalho em locais que foram pulverizados recentemente (RIGOTTO, 2011).

Entre os agrotóxicos utilizados em larga escala na monocultura da banana podemos destacar os mencionados no quadro abaixo:

**Quadro 1:** Lista de agrotóxicos utilizados na monocultura da banana de acordo com a praga a ser combatida e classificação por grupo químico e classe toxicológica.

Cultura	Praga/Aplicação	Venenos Utilizados	Grupo Químico	Classe Toxicológica	Classe Ambiental
Banana	Moleque da Bananeira Ou Broca-do-rizoma  (Cosmopolitessordidus)	Carbofuran (Furadan)– Carbofurano	Carbamatos	I (Extremamente Tóxico)	II
		Gramoxil (Paraquate + Diuron)	Bipiridílio	II (Altamente Tóxico)	II
		Gramoxone (Paraquate)		I (Extremamente Tóxico)	II
		Score (Difenoconazol)	Triazóis	I (Extremamente Tóxico)	II
	Sigatoka Amarela	Propiconazol	Triazóis	II (Altamente Tóxico)  e III (Medianamente Tóxico)	II
		Trifloxistrobina	Estrobilurina		
		Tebuconazol	Triazóis		
		Piraclostrobina	Estrobilurina		
		Epoconazol	Triazóis		

**LEGENDA:** Classe ambiental II – Muito perigoso

Adaptado de Rigotto et al., 2011. Agrotóxicos, trabalho e saúde.

Além dos pesticidas utilizados em larga escala no agronegócio da banana, os trabalhadores da região estão expostos desde o início da sua vida laborativa a uma diversidade de produtos químicos utilizados nas suas lavouras de agricultura familiar. Esta prática além de bastante disseminada, não permite critérios de escolha do produto a ser utilizado. A exposição é múltipla, envolvendo no mínimo quatro tipos de produtos diferentes, sendo que o contato com os produtos ocorre em caráter sazonal, permitindo intervalos entre a exposição (RIGOTTO, 2011).

O maior agravante em relação à exposição desses trabalhadores é o fato de não disporem de equipamentos de proteção individual adequados durante o contato com os agrotóxicos. Outra questão que merece ser discutida é a eficácia e a disponibilidade desses equipamentos. O equipamento recomendado para evitar a inalação do produto tóxico é a máscara com filtro de carvão ativado, que precisa ser trocado periodicamente (VEIGA, 2007). Esta máscara, na maior parte das vezes, não está disponível, portanto o trabalhador fica exposto pelo não fornecimento dos equipamentos pelo empregador ou pela falta de recursos do pequeno produtor para adquiri-los (RIGOTTO, 2011).

Os agrotóxicos compreendem um grupo heterogêneo de agentes químicos desenvolvidos para o controle de uma variedade de pragas nas plantações. Eles são classificados de acordo com o tipo de praga a ser combatida em: inseticidas, herbicidas ou fungicidas (BOLOGNESI, 2003). A maioria desses produtos é composta por agentes lesivos ao ser humano como hidrocarbonetos aromáticos, organofosforados, carbamatos e organoclorados, entre outros, e tem a capacidade de se acumular no meio ambiente por vários anos. Vale ressaltar que além dos elementos químicos utilizados diretamente no controle de pragas, fazem parte da sua composição veículos de contaminação, liberados nas reações químicas durante a sua síntese. Como exemplo desses componentes podemos citar o benzeno, elemento sabidamente mielotóxico e carcinogênico (GUYTON, 2015).

Os agrotóxicos são divididos em classes toxicológicas (TABELA 01) pela capacidade que eles têm em provocar a morte de metade dos animais expostos a determinada concentração. Esta dose, chamada DL 50 é a dose necessária de uma dada substância para matar 50% de uma população em teste. A sua determinação é feita expondo cobaias a diferentes doses da substância até ser determinada aquela que mata apenas metade da população testada. A DL50 é frequentemente usada como um indicador da toxicidade aguda de uma substância; quanto maior a dose que será letal, menos tóxica é considerada.

**Tabela 1** – Classificação dos Agrotóxicos segundo os efeitos à saúde humana

<b>Classe Toxicológica</b>	<b>Descrição</b>	<b>Faixa Indicativa</b>
I	Extremamente Tóxicos DL50 < 0,05g/kg	Vermelho Vivo
II	Muito Tóxicos DL50 - 0,05 a 0,5 g/kg	Amarelo Intenso
III	Moderadamente Tóxicos DL50 - 0,5 a 5 g/kg	Azul Intenso
IV	Pouco Tóxicos DL50 > 5g/kg	Verde Intenso

**Fonte:** BRASIL, 1997 e Peres, 2003.

O glifosato é o herbicida mais vendido no Brasil e no mundo (LONDRES, 2011). Considerado pelos usuários muitas vezes como um produto mais fraco, talvez pela classificação da ANVISA como pouco tóxico, é um dos mais conhecidos pela população da região. Em 2008, a ANVISA incluiu o glifosato entre os 14 ingredientes ativos que foram colocados em reavaliação toxicológica, pelo seu risco de elevada toxicidade (CARNEIRO, 2012). Em decorrência do elevado número de trabalhos evidenciando o potencial carcinogênico do glifosato, a Agência Internacional para Pesquisa no Câncer (IARC) a partir de 2015 considerou em sua monografia como um produto provavelmente carcinogênico para humanos – Grupo 2A (GUYTON, 2015).

Entre os pesticidas mais utilizados na região podemos destacar o glifosato e o carbofurano como potenciais carcinogênicos; o metamidofós e o paration como potencialmente pré-carcinogênicos e o monocrotofós como não carcinogênicos (GUYTON, 2015). Devido a inúmeros estudos recentes que apontam efeitos deletérios do glifosato, este pesticida e vários outros estão sendo reavaliados quanto à sua classificação pela ANVISA.

Alguns desses agentes são capazes de produzir efeito carcinogênico através de vários mecanismos tais como: genotoxicidade, promoção tumoral, ativação hormonal e imunotoxicidade (GREIM, 2015; BRUSICK, 2016).

#### 1.4 – Associação entre pesticidas e neoplasias

Vários estudos epidemiológicos têm estabelecido uma estreita relação entre a exposição a pesticidas e o desenvolvimento de neoplasias hematológicas como Linfomas Não-Hodking (LNH) e Leucemia Mielóide Aguda e Leucemia Linfóide Aguda e Síndrome Mielodisplásica. Os estudos com maior força de evidência estão relacionados no quadro abaixo.

**Quadro 2** – Lista de estudos epidemiológicos que estabeleceram forte associação entre a exposição crônica a agrotóxicos e o desenvolvimento de câncer.

Autor	Estudo	Associação
Keller-Byrne, 1995	Metanálise	Leucemias
Keller-Byrne, 1995	Metanálise	Câncer de Próstata
Khuder et al., 1997	Metanálise	Mieloma Múltiplo
Schinasi, 2014	Metanálise	Linfomas Não-Hodgkin
Jin et al., 2014	Metanálise	Síndrome Mielodisplásica
Hu et al., 2017	Organofosforados Metanálise	Linfomas Não-Hodgkin
Smith et al., 2017	Organoclorados Metanálise	Linfomas Não-Hodgkin

No Ceará, uma pesquisa epidemiológica retrospectiva realizada por Ellery e colaboradores para avaliar a incidência de câncer em agricultores no estado observou que esta população possui maior razão de chances para leucemias (OR - 6,35), mieloma múltiplo (OR - 1,83), linfomas (OR - 1,63) entre outros tipos de neoplasias. Esses dados foram obtidos após avaliação de pacientes atendidos em centro de referência para o tratamento do câncer comparando trabalhadores rurais com os demais pacientes atendidos.

A exposição aos xenobióticos ambientais também está associada à ocorrência de deleções nos cromossomos 5 e 7, levando ao desenvolvimento de Síndrome Mielodisplásica (SMD), Leucemia Mielóide Aguda (LMA) e Leucemia Linfóide Aguda (LLA) (POMBO-DE-OLIVEIRA, 2017). Esta observação pode dar suporte à presença de genes importantes nesses cromossomos, cuja perda levaria ao bloqueio da diferenciação ou à proliferação celular descontrolada. Algumas metanálises foram realizadas, utilizando estudos do tipo caso-controle realizados a partir de pacientes acometidos pela neoplasia em que a história ocupacional pregressa era positiva para pesticidas (JIN, 2014; SCHINASI, 2014; HU, 2017; SMITH, 2017).

Alguns pesquisadores demonstraram os efeitos clastogênicos do herbicida glifosato e do inseticida carbofurano nas células da medula óssea em modelos experimentais. Esses estudos confirmaram a ação genotóxica dos pesticidas avaliados na fase inicial da carcinogênese em células hematopoéticas (PRASAD, 2009). As células hematopoéticas são particularmente sensíveis ao estresse oxidativo e se tornam mais vulneráveis a ação genotóxica dos pesticidas (LÓPEZ-LÁZARO, 2018). Esses estudos experimentais comprovam que os pesticidas têm propriedades mutagênicas e podem induzir alterações cromossômicas ou lesões no DNA das células hematopoéticas (GIRI, 2012). As células tronco da medula óssea, devido à suas propriedades de auto-renovação e diferenciação, são capazes de persistir ao longo da vida. Esse fenômeno aumenta várias vezes o risco de acumular mutações deletérias que possam levar ao desenvolvimento de neoplasias (BIECHONSKI, 2017).

Estudos *in vitro* evidenciam que os pesticidas organofosforados aumentam a expressão do gene *TP53* em células epiteliais mamárias humanas e, pelo efeito genotóxico, podem ser um fator de iniciação para a transformação maligna dessas células (ROY, 2007). Esses tóxicos também são capazes de induzir neoplasia mamária através de instabilidade genômica no *TP53* (CALAF, 2009). Cabello et al. conseguiram induzir mutação no gene *TP53* em células do epitélio mamário de cobaias após exposição aos organofosforados, levando à progressão do câncer de mama.

A primeira evidência que relacionou a ocorrência de uma neoplasia com translocações entre cromossomos foi a descoberta do cromossomo Filadélfia – t(9;22)(q34;q11) em pacientes com Leucemia Mielóide Crônica. Desde então, têm-se questionado se os pesticidas podem ser responsáveis pelas translocações cromossômicas observadas nos portadores de neoplasias hematopoéticas como Leucemias e Linfomas Não-Hodgkin (GAUDUCHON, 2004). Nos Linfomas Não-Hodgkin (LNH), uma das translocações mais encontradas é a

t(14;18)(q32;q21), que envolve o sítio do proto-oncogene *BCL-2*, e é recorrente em 70-90% dos casos de Linfoma Folicular e em 20-30% dos casos de Linfomas Difusos de Grandes Células B (BLAIR, 2009).

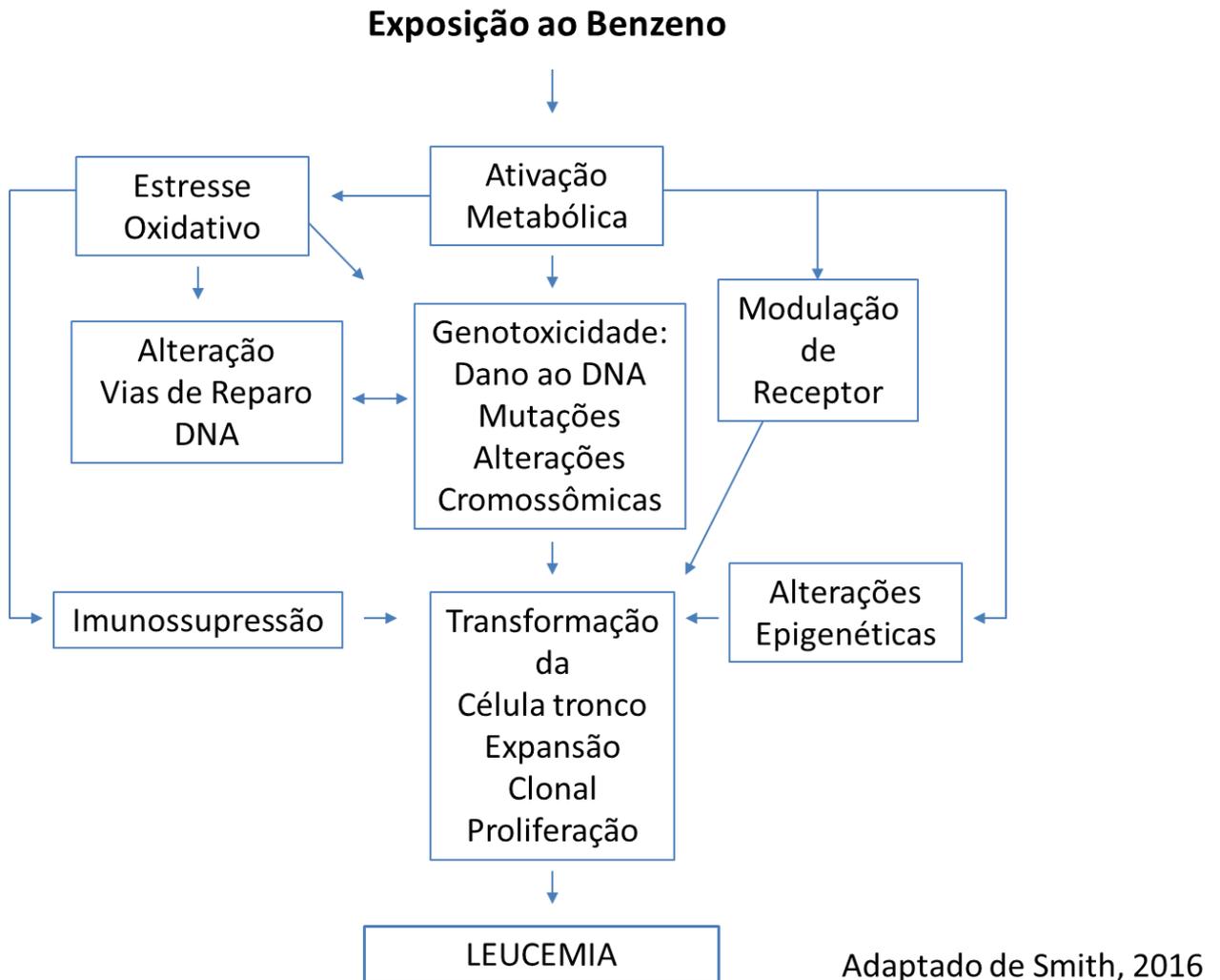
Vários estudos tem evidenciado que a exposição a pesticidas é especificamente associada a um maior risco de desenvolvimento de t(14;18) e LNH (SCHINASI, 2014; SMITH, 2017; HU, 2017) e que esta translocação é particularmente frequente nos agricultores expostos a pesticidas (CHIU, 2006). No intuito de elucidar essa forte associação, Agopian e colaboradores (2017) demonstraram, claramente, em um estudo de coorte em agricultores expostos que a expansão dos clones com t(14;18) constitui precursores para o desenvolvimento de Linfoma Folicular. Os autores observaram que a dinâmica da evolução clonal observada nesses agricultores através de imunohistoquímica é notavelmente semelhante à observada em Linfoma Folicular (RUMINY, 2008) e transformação para Linfoma Difuso de Grandes Células B (CARLOTTI, 2009). Esses dados sugerem que o processo de seleção dos clones malignos já ocorre nas fases iniciais de desenvolvimento do linfoma (AGOPIAN, 2017).

Cada vez se torna mais evidente que é necessário um conjunto de diferentes alterações para converter uma célula normal em uma célula transformada e, finalmente, em uma neoplasia (HANAHAN E WEINBERG, 2011). Os pesticidas parecem atuar nesse processo complexo de várias maneiras e podem agir através de múltiplos mecanismos para induzir o câncer (GOODSON, 2015; GUYTON, 2009).

Recentemente, a Agência Internacional para Pesquisas no Câncer (IARC) publicou uma lista de mais de 100 agentes classificados como carcinogênicos para seres humanos (SMITH, 2016). Foram relatadas cinco das principais características envolvidas na carcinogênese para os organofosforados, que seriam a genotoxicidade, o estresse oxidativo, a inflamação, os efeitos mediados por receptores e proliferação celular ou apoptose. Foram descritas também três propriedades para o DDT, que seriam a imunossupressão, efeitos mediados por receptores e estresse oxidativo. Na mesma publicação descreveram o potencial do glifosato para causar genotoxicidade e estresse oxidativo, fornecendo evidências para sua classificação no Grupo 2A como prováveis carcinógenos humanos (GUYTON, 2015)

Já existem claras evidências de que o benzeno possui várias características que podem induzir a carcinogênese. McHale e colaboradores (2012) conseguiram descrever os diversos mecanismos pelos quais o benzeno pode induzir a transformação leucêmica (Figura 6). Tais mecanismos são induzidos pelas várias propriedades do benzeno como: ativação metabólica, estresse oxidativo, genotoxicidade, alteração das vias de reparo do DNA, modulação de

receptores, alterações epigenéticas, imunossupressão e alteração da proliferação celular (SMITH, 2016).



**Figura 6:** Ilustração dos mecanismos para transformação para leucemia após exposição ao benzeno

### 1.5 O controle do ciclo celular e a Carcinogênese no medula óssea

Acredita-se que mutações adquiridas ao longo da vida nas células-tronco pluripotentes contribuem para a carcinogênese. O surgimento de um clone anômalo a partir de uma instabilidade genômica, principalmente em células precursoras hematopoiéticas ocorre após sucessivas alterações genéticas, citogenéticas e epigenéticas, ocasionando mudanças funcionais nas células, e, conseqüentemente, evolução para doença (NAEM, 2008). Essas alterações podem ser causadas pela idade (devido ao encurtamento dos telômeros), pela

exposição a agentes genotóxicos ou por alguma condição inflamatória (ADES, 2014). Aproximadamente 80% dos pacientes com neoplasias na medula óssea apresentam mutação em mais de um gene, sendo que a maioria apresenta mutações que alteram a sequência e a função de oncogenes e genes supressores tumorais (CHAMSEDDINE, 2016). Segundo Bejar e colaboradores (2011) as etapas associadas à carcinogênese na medula óssea incluem: auto-renovação de uma célula-tronco hematopoiética, ganho de vantagem proliferativa do clone, defeitos ou bloqueio de diferenciação, instabilidade genética e epigenética e supressão da hematopoiese normal. As lesões do DNA induzem uma resposta ao dano nas células tronco hematopoiéticas, sendo que o controle desta resposta é realizado pelas proteínas dos pontos de checagem, que interrompem o ciclo celular com o intuito de prevenir ou retardar a instabilidade genética, aumentando a senescência e provocando a apoptose. Quando ocorrem danos nos pontos de checagem, essas células podem se proliferar levando ao surgimento de um clone maligno (ZHOU, 2015).

### **1.5.1 Controle e regulação do Ciclo Celular**

A manifestação de uma neoplasia está relacionada a falhas no controle do ciclo celular, resultante de mutações nas vias de sinalização ou por lesões nos genes que codificam proteínas do ciclo celular (OTTO E SICINSKI, 2017). O processo de divisão celular é estritamente regulado para manter a estabilidade cromossômica, garantindo a separação correta dos cromossomos entre duas células filhas (CHEN E LIU, 2016). A correta segregação cromossômica ocorre quando as cromátides irmãs são ligadas após a replicação e depois são segregadas para polos opostos antes do processo de citocinese (divisão das células). Essa segregação é mediada por microtúbulos do fuso, que estabelecem uma conexão estável e biorientada com cada cromossomo através dos cinetócoros, grandes complexos proteicos que se reúnem no DNA centromérico, permitindo o alinhamento dos cromossomos (LONDON E BIGGINS, 2014). Para que a segregação ocorra corretamente, deve existir uma conexão estável entre o cinetócoro e o fuso, pois os cinetócoros não ligados durante a segregação podem causar perdas cromossômicas (CHEN E LIU, 2016). Para evitar erros, o processo de divisão celular é monitorado por um mecanismo de vigilância, o ponto checagem mitótico, que detecta o estado de ligação dos cinetócoros e é silenciado quando todos os cinetócoros estão ligados de forma estável (SCHVARTZMAN, 2010).

Vários genes e proteínas estão envolvidos na regulação dos pontos de checagem mitóticos, sendo que um aumento ou diminuição da expressão dessas proteínas podem levar a

danos no sistema de checagem, que desencadeiam erros na divisão celular, podendo contribuir para a instabilidade cromossômica (SCHUYLER, 2012).

### 1.5.2 Genes relacionados ao ponto de checagem mitótico

A segregação inapropriada dos cromossomos durante a mitose pode ser um fator importante no surgimento de aneuploidias. Conforme descrito em vários tipos de tumores, defeitos nos pontos de checagem permitem que as células prossigam com a mitose antes da formação da maquinaria apropriada, ocasionando erros na segregação cromossômica (WANG, 2003).

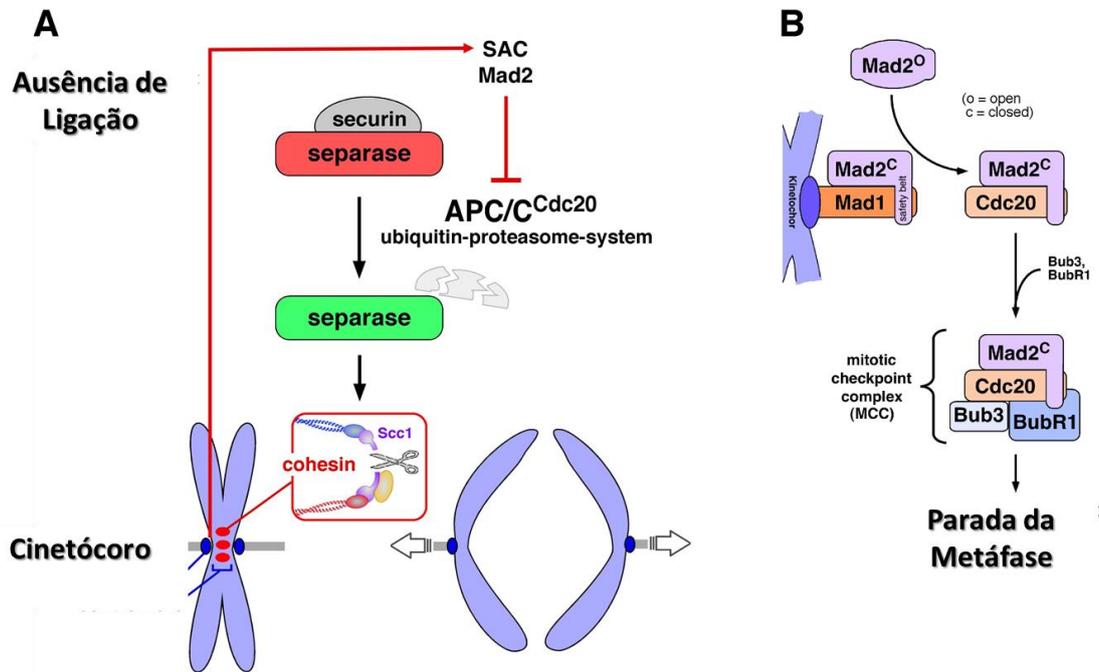
O ponto de checagem mitótico assegura que os cromossomos sejam corretamente segregados, evitando que as células com cromossomos desalinhados finalizem a mitose. Essa verificação consiste de três componentes: um sensor que detecta a presença de cromossomos desalinhados; um transdutor que amplifica o sinal gerado pelo sensor; um inibidor que é capaz de parar o ciclo celular até que todos os cromossomos estejam corretamente alinhados (HEINRICH, 2013).

O Complexo Promotor da Anáfase (CPA) é um regulador primário do ciclo celular, ativado pelo **CDC20** (Cell division cycle 20), que permite que o CPA se ligue aos seus substratos, tais como securina e ciclina B, e assim leva à anáfase (SCHUYLER, 2012; WANG, 2013). Quando o ponto de checagem é ativado a atividade do CPA é inibida, impedindo a transição da metáfase para a anáfase (FIGURA 7) (HEINRICH; 2013). O CDC20 é sintetizado continuamente durante a prometáfase e a metáfase, se o resultado do ponto de checagem for satisfatório, o CDC20 poderá ativar o CPA e promover a anáfase. Por outro lado, o ponto de checagem inibe as funções do CPA através da inativação do CDC20 pelo complexo de checagem mitótico (CCM) (constituído pelo MAD2, BUB1 e BUB3) que se liga ao CDC20 impedindo a ativação do CPA (FAESEN, 2017). Essa inativação ocorre devido à ligação do MAD2 em sua forma livre (“aberta”) com o CDC20, formando o CCM, que se liga ao CPA, tornando-o inativo e levando ao bloqueio do ciclo celular até o completo e correto alinhamento dos cromossomos ao fuso mitótico.

A formação do complexo Mad2-Cdc20 envolve a conversão de MAD2 de uma conformação “aberta” para uma conformação “fechada” com o CDC20 (Figura 7) (LONDON E BIGGINS, 2014).

Enquanto MAD2 estiver ligado ao CDC20, o CPA não é ativado. Após todos os cromossomos estarem alinhados corretamente na metáfase, MAD2 dissocia-se de CDC20, permitindo a ativação do CPA. Desta forma, MAD2 funciona como um sensor do ponto de

checagem mitótico, monitorando a conexão dos cinetócoros com os microtúbulos, impedindo a atividade de CPA (BRAUNSTEIN, 2007).



**Figura 7:** A - Ilustração da transição da fase de metáfase para anáfase B – Modelo do ponto de checagem mitótica

Vários estudos têm relatado o papel oncogênico do CDC20, estando relacionado ao desenvolvimento e progressão de cânceres humanos. Devido a isso, estudos têm sido realizados para o desenvolvimento de medicamentos alvo específicos (WANG, 2015). MAD2 tem se apresentado hiperexpresso em vários tipos de neoplasias, geralmente associado com prognóstico desfavorável e promovendo a instabilidade genética em estudos com cultura de células (SOTILLO, 2007).

Recentemente, nosso grupo demonstrou que a expressão de *CDC20* estava aumentada nos pacientes com SMD que apresentavam dismegacariopose, plaquetopenia e nos pacientes de alto risco. No mesmo estudo, foi possível observar que a expressão de *MAD2* estava diminuída nos pacientes com 2 ou 3 citopenias e neutrófilos abaixo de  $800/\text{mm}^3$  (BORGES, 2018).

### 1.5.3 Genes relacionados ao fuso mitótico

Existem outros grupos de genes e proteínas que estão associados à segregação inapropriada dos cromossomos durante a mitose. Dentre eles destaca-se a família das Auroras

quinases, uma família de serinas/treoninas que participam ativamente na regulação da duplicação dos centrossomos, do alinhamento e segregação cromossômica (GOLDENSON e CRISPINO, 2014). As alterações de expressão dessas proteínas estão fortemente relacionadas à instabilidade cromossômica, aneuploidia e progressão tumoral em diferentes tumores e neoplasias hematológicas. Foi demonstrado elevada expressão de AURKA (66,3% dos casos) e AURKB (40,8% dos casos) em células CD34+ de pacientes com leucemia mielóide aguda, quando comparada a doadores sadios (HUANG, 2008).

As funções da Aurora A e da Aurora B estão associadas com a instabilidade cromossômica, monitoramento dos pontos de checagem mitóticos e formação do fuso mitótico (GOLDENSON e CRISPINO, 2014). A Aurora A (AURKA) está localizada nos centrossomos e nos polos do fuso mitótico e atua, durante a mitose, na maturação e separação dos centrossomos, formação do fuso mitótico e na dinâmica dos microtúbulos. Já a Aurora B (AURKB) está localizada nos centrômeros, e atua no alinhamento dos cromossomos e no monitoramento do ponto de checagem mitótico (AFONSO, 2016).

### **Aurora A (AURKA)**

A superexpressão de AURKA tem sido demonstrada em vários tipos de tumores humanos, incluindo câncer pancreático, de bexiga, coloretal e leucemia mielóide aguda (LUCENA-ARAÚJO, 2011). Esse aumento da expressão se encontra associado ao aumento do número de centrossomos e de fusos mitóticos, que permanecem na célula como consequência da falha na citocinese (LINDON, 2016).

Dentre as funções da Aurora A estão a maturação e separação dos centrossomos, formação do fuso mitótico, promotor da inicialização da mitose, alinhamento dos cromossomos na metáfase e citocinese. Na ausência da Aurora A, o ponto de checagem detecta defeitos no alinhamento dos cromossomos e interrompe a divisão celular, porém, algumas células com defeitos na AURKA podem escapar do bloqueio e terminar o processo de divisão, levando a erros de segregação cromossômica (GOLDENSON E CRISPINO, 2015). Quando a Aurora A se encontra hiperexpressa, ela age suprimindo a proteína MAD2 e estimulando a CDC20, alterando o funcionamento correto do CPA e sobrepondo o ponto de checagem mitótico, como consequência, seu aumento de expressão interfere em diversos processos celulares que resultam na instabilidade genômica (GOLDENSON E CRISPINO, 2015). O aumento dos níveis de expressão da Aurora A pode ser o resultado da amplificação de genes, indução de transcrição gênica ou modificações pós traducionais (KITZEN, 2010).

Nosso grupo demonstrou através de Hibridização *in situ* por imunofluorescência (FISH), amplificação do gene *AURKA* em 10% dos casos de pacientes com SMD, sugerindo que o aumento da expressão desse gene pode estar relacionado à patogênese da doença (HEREDIA, 2014). A importância desse resultado foi recentemente enfatizada em citação de Otto, 2017 (Nature).

### **Aurora B (*AURKB*)**

A superexpressão de *AURKB* tem sido observada em diferentes tipos de câncer, incluindo carcinoma hepatocelular e cervical, câncer gástrico, doenças linfoproliferativas e leucemias agudas (LUCENA-ARAÚJO, 2011).

Durante a mitose, a Aurora B tem um importante papel na condensação dos cromossomos, segregação e orientação bipolar (GOLDENSON E CRISPINO, 2015). A Aurora B fosforila proteínas da cromatina para auxiliar na condensação dos cromossomos e contribui para o ponto de checagem mitótico através do direcionamento da conexão entre o cinetócoro e microtúbulos. Enquanto todos os cromossomos não estiverem bi orientados, através da ação da *AURKB*, o CPA permanece desativado, apenas sendo liberado pelo ponto de checagem após a correta reorganização cromossômica, possibilitando a anáfase. Assim, o ponto de checagem mitótico é comprometido pela falta de atividade de Aurora B (KITZEN, 2010). Aurora B também é essencial para a realização correta da citocinese. Sem a ação da *AURKB*, as células filhas permanecem ligadas através de pontes citoplasmáticas, gerando defeitos de formação cromossômicos (PORTELLA, 2011). Esse gene encontra-se hiperexpresso em diversos tipos de tumores e está correlacionado com múltiplos defeitos na maquinaria mitótica, podendo dar origem a aneuploidias e outras alterações citogenéticas (GOLDENSON E CRISPINO, 2015).

Em pacientes com SMD, nosso grupo demonstrou através de imuno-histoquímica que a expressão de *AURKB* estava aumentada nos pacientes com cariótipo alterado quando comparados aos com cariótipo normal (GENGA, 2015). Ainda não se sabe se o aumento dos níveis de expressão da *AURKB* em tumores é um reflexo da elevada proliferação das células neoplásicas ou se ela está relacionada com mecanismos da tumorigênese (PORTELLA, 2011).

#### **1.5.4 Genes reguladores do ciclo celular (*CDKN1A*)**

Estudos recentes têm demonstrado que a Aurora B pode fosforilar p53, suprimindo a ação desse supressor tumoral. Da mesma forma, a inativação da *AURKB* leva a um aumento da atividade do p53 e indução do *CDKN1A* (também conhecido como P21), uma proteína

inibidora de ciclinas dependentes de quinases e, conseqüentemente, inibidora do ciclo celular, que é regulada pelo p53 (KARIMIAN, 2016). As ciclinas dependentes de quinases (CDK) são uma família de proteínas que atuam nas transições de G1 para S e de G2 para mitose (CAZZALINI, 2010). Vários estudos relacionam a função do inibidor de ciclina dependente de quinase à carcinogênese de diversos tumores. (KARIMIAN, 2016). Níveis muito elevados de CDKN1A, devido a lesões no DNA, resultam no bloqueio do ciclo celular em G2 ou em uma saída prematura da mitose, sem que haja a segregação cromossômica. O aumento intermediário dos níveis de CDKN1A permitem que a célula inicie a mitose, porém, resultam em uma saída prematura, devido a baixa atividade das CDKs (TRAKALA, 2013). Além disso, o *CDKN1A* tem apresentado influência na expressão de genes relacionados ao ciclo celular, ao reparo do DNA e na regulação da apoptose (KARIMIAN, 2016). O *CDKN1A* tem uma forte afinidade pelo antígeno nuclear de proliferação celular (ANPC), tornando-o o principal mediador do bloqueio do ciclo celular em resposta a danos no DNA (CAZZALINI, 2010).

## **1.6 – Vigilância à saúde do trabalhador**

A necessidade de conceber e gerar propostas integrais que orientem as intervenções sobre a situação de saúde tem conduzido à proposição de operações e ações de vigilância em saúde. A maioria das intervenções em saúde está voltada para o controle dos danos (morte, doenças e agravos), apresentadas como óbitos, sequelas ou casos. Neste tipo de controle, destaca-se a assistência médico-hospitalar com necessidade de grandes investimentos financeiros e pouca ou nenhuma ação preventiva (ROUQUAIROL E ALMEIDA FILHO, 2003).

Para outras doenças e agravos como neoplasias, doenças ocupacionais e intoxicações ambientais, é possível identificar um momento em que há indícios de danos, porém os indivíduos ainda estão assintomáticos. A sua descoberta implica em ações que buscam o diagnóstico precoce por meio de testes de screening, exames periódicos de saúde e consultas médicas. Porém, antes mesmo destas evidências de danos serem detectadas pelas técnicas citadas anteriormente, haveria um momento em que seria possível detectar indícios de exposição, ou mesmo possíveis alterações genéticas (ROUQUAIROL E ALMEIDA FILHO, 2003). Os indivíduos e populações sob tais circunstâncias seriam consideradas suspeitos.

Um exemplo comum desta situação é a avaliação rotineira de indivíduos expostos aos derivados do benzeno (frentistas, pintores e mecânicos) com a realização de hemograma seriado para a detecção precoce de leucopenia. No acompanhamento de trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos, esta prática também é realizada. No entanto, o achado de leucopenia pode ser considerado um sinal tardio de lesão nas células precursoras hematopoéticas da medula óssea, sendo muitas vezes o quadro irreversível. A detecção precoce através da descoberta de alvos moleculares poderia evitar lesões irreversíveis nas células precursoras hematopoéticas (PINHEIRO, 2008).

Vários marcadores têm se mostrado úteis para monitorar a exposição humana a agentes mutagênicos e carcinógenos. No Brasil, Pacheco e cols. demonstraram instabilidade cromossômica induzida por agroquímicos em linfócitos de sangue periférico de trabalhadores rurais na região de Passo Fundo, Rio Grande do Sul. As anormalidades cromossômicas podem ser detectadas pelas técnicas de cultura de curta duração por Banda G (clássica), sendo detectadas aneuploidias, deleções e translocações cromossômicas quando do estudo de células da medula óssea.

Pesquisadores sugerem que a identificação precoce de alterações genéticas em indivíduos expostos aos carcinógenos é uma importante estratégia de vigilância em saúde com objetivo de diminuir o risco e evitar o desenvolvimento de neoplasias da medula óssea (BATTERSHILL, 2006) (KHAN, 2008). Dessa forma, os alvos moleculares podem ser utilizados como biomarcadores do efeito genotóxico na população exposta a agrotóxicos (NORPPA, 2004). O emprego destes marcadores poderia causar um grande impacto na prevenção do câncer e na saúde pública de uma forma geral (ROULLAND, 2009).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral:

Avaliar os níveis de expressão do mRNA dos genes relacionados aos mecanismos de regulação do ciclo celular (*CDKN1A*), ponto de checagem mitótico (*MAD2* e *CDC20*) e fuso mitótico (*AURKA*, *AURKB*) nas células da medula óssea de trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos.

### 2.2 Objetivos Específicos:

- 1- Avaliar a presença de citopenias pelo hemograma;
- 2- Identificar alterações citogenéticas por Banda G de células da medula óssea de trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos;
- 3- Avaliar a expressão dos genes *AURKA*, *AURKB*, *MAD2*, *CDC20* e *CDKN1A* por qRT-PCR;
- 4- Comparar os níveis de expressão dos genes entre os diferentes grupos de trabalhadores;
- 5- Correlacionar os níveis de expressão dos genes com as alterações citogenéticas encontradas;
- 6- Correlacionar os níveis de expressão dos genes com as características epidemiológicas e de exposição tóxica dos trabalhadores.

### 3 SUJEITOS, MATERIAIS E MÉTODO

#### 3.1 - Tipo de Estudo

O estudo realizado foi do tipo epidemiológico, descritivo e transversal realizado nos municípios de Limoeiro do Norte e Potiretama no período entre 2013 e 2015

#### 3.2 População do estudo

Foram avaliados no estudo trabalhadores rurais da região da Chapada do Apodi, em Limoeiro do Norte (a 198 km de Fortaleza - CE). Nesse local, estão instaladas empresas nacionais e multinacionais produtoras de frutas e grãos que pulverizam agrotóxicos nas plantações, tanto com o auxílio de tratores como de aviões. A cultura utilizada para estudo foi a cultura da banana.

Foi feito um levantamento na região que identificou a ocorrência de 20% de alterações hematológicas no sangue periférico da população estudada (Rigotto et al. 2011). A partir deste levantamento, utilizando-se uma precisão absoluta de 10% e um nível de significância de 5%, calculou-se o grupo amostral (SITE) de 100 agricultores que foram divididos em três grupos:

- **Grandes Produtores** = 45 trabalhadores do agronegócio que estão expostos aos mesmos tipos de agrotóxicos de forma intensiva e maneira uniforme;
- **Agricultura Familiar** (Pequenos Produtores) = 45 trabalhadores que utilizam uma mistura complexa de agrotóxicos de forma sazonal e sem orientação adequada;
- **Agricultura Ecológica** = 10 trabalhadores da mesma região que já utilizaram pesticidas, mas que estavam há mais de 05 anos sem exposição a agrotóxicos (grupo controle).

Para obtenção dos tipos de agrotóxicos utilizados na região, utilizou-se o levantamento feito por Rigotto et al., 2011.

#### 3.3 Aspectos Éticos

A presente pesquisa foi submetida e aprovada (Nº do processo: 016.02.11) pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Hospital Universitário Walter Cantídio, utilizando-se de Termos de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (APÊNDICE A).

Nestes termos, a equipe executora desta pesquisa comprometeu-se a cumprir todas as diretrizes e normas reguladoras descritas na Resolução nº 466 de 12 de dezembro de 2012 do Conselho Nacional de Saúde que aprova as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos.

### 3.4 Coleta de dados

O grupo amostral foi constituído de 95 trabalhadores rurais nos quais foram levantadas, através de questionário semi-estruturado (APÊNDICE A) informações como: idade, escolaridade, hábitos de vida, etilismo, tabagismo, história patológica e neoplasias prévias, tipo de produto e tempo de exposição ao inseticida, uso de medicamentos e exposição a radiação prévia.

#### **Crítérios de Inclusão:**

1. Gênero masculino
2. Idade superior a 18 anos e inferior a 60 anos;
3. Exposição ocupacional a agrotóxicos há pelo menos 01 ano;

#### **Crítério de exclusão:**

- História prévia ou atual de neoplasias e uso de quimioterapia;
- Uso de medicamentos genotóxicos;
- Exposição a Radiação Terapêutica ou ocupacional.

### 3.5 Análise Laboratorial

Todos os agricultores do estudo foram submetidos a:

- Hemograma automatizado;
- Citogenética clássica por Banda-G de aspirado medular.
- Expressão dos genes *AURKA*, *AURKB*, *MAD2*, *CDC20* e *CDKN1A* por PCR em tempo real;

Após análise dos resultados, os pacientes nos quais se observou alguma alteração laboratorial foram encaminhados para acompanhamento ambulatorial no Serviço de Hematologia do Hospital Universitário Walter Cantídio da Universidade Federal Ceará.

### 3.6 Coleta das amostras de medula óssea

Todas as amostras foram coletadas por médico hematologista experiente. Para a avaliação do Cariótipo por banda G, as amostras foram coletadas em seringa heparinizada. As amostras para a obtenção do pool celular foram coletadas em tubos Vacutainer® contendo EDTA. Para a separação das células do pool celular da medula óssea, realizou-se a transferência da amostra para um tubo do tipo Falcon de 50 mL onde foi lavada com solução de lise (25mL de solução de cloreto de amônio 0,144M e bicarbonato de amônio 0,01 M). O

conteúdo foi agitado lentamente, deixado em banho de gelo por 15 minutos e centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos a 4° C. Em seguida foi desprezada a fase aquosa e acrescentado 250µL de PBS e, posteriormente, 750uL de Trizol LS Reagent® (Invitrogen, EUA). O material foi homogeneizando com pipeta até dissolução completa. Após este procedimento, o material foi armazenado no freezer a -80°C.

### **3.7 Cariótipo por Banda G**

Os cariótipos foram realizados de acordo com os protocolos já estabelecidos pelo Laboratório de Citogenômica do Câncer, segundo a técnica descrita por Chauffaille e adaptada por Pinheiro (PINHEIRO, 2009). A medula óssea foi colhida em heparina e de forma estéril foi dividida em dois frascos contendo 7 mL de meio RPMI 1640 (pH 7,0), 3 mL de soro fetal bovino e 100µl de L-glutamina. Este material foi cultivado por 24 horas em estufa a 37°C. Uma hora antes do término da cultura foram adicionados 50 uL de colchicina (Colcemid®), por 30 minutos. Em seguida, o material foi centrifugado e ressuspensão em solução hipotônica de KCl 0,075 M e fixado em solução de ácido acético e metanol (3:1), por 4 vezes. Para confecção das lâminas para análise, o material foi gotejado em lâminas de microscopia óptica e em seguida foram aquecidas por 3 minutos em micro-ondas na potência alta. O bandeamento será realizado pela técnica de tripsina e as bandas coradas com o kit Panótico®. Foram analisadas pelo menos 20 metáfases de cada paciente, sendo capturadas e analisadas em sistema computadorizado com software para cariotipagem CytoVision®. Os resultados das análises citogenética de medula óssea foram estabelecidos de acordo com os critérios do Sistema Internacional de Nomenclatura Citogenética Humana (ISCN) (SHAFFER E TOMMERUP 2014).

### **3.8 qPCR (PCR quantitativa em tempo real)**

#### **3.8.1 Extração de RNA total**

A extração de RNA das células do pool medular dos pacientes com SMD e dos controles foi realizada a partir da utilização do Trizol LS Reagente® de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. Para cada 10<sup>6</sup> células armazenadas em 1mL de Trizol Reagente® foram adicionados 200µL de Clorofórmio para desproteíntização e 10µL de glicogênio, foram homogeneizadas em vórtex e, em seguida, centrifugadas a 14.000rpm por 15 minutos a 4° C. Retirou-se o sobrenadante de cada amostra, transferindo para novos tubos, seguidos de precipitação com 400µL de isopropanol, e incubado por 60 minutos a -20°C, após esse período, foi realizada outra centrifugação a 14.000rpm por 30 minutos a 4°C e o

sobrenadante foi descartado por inversão. O pellet formado foi ressuspensão em etanol 70% (v/v) e novamente centrifugado por 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi novamente descartado por inversão e, após seco, o pellet foi diluído em água livre de RNase. Foram realizadas leituras espectrofotométricas nos comprimentos de ondas de 230, 260 e 280 nm, obtendo-se suas relações para posterior aferição de contaminação das amostras. A qualidade das amostras de RNA também foi verificada por eletroforese em gel de agarose 2%.

### **3.8.2 Síntese de cDNA**

Após a extração do RNA, 2000ng de cada amostra foram utilizados na síntese do cDNA. A síntese do cDNA foi realizada com a utilização do Kit para Transcrição Reversa da Applied Biosystems® (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit Applied Biosystems®), de acordo com as recomendações do fabricante. O cDNA foi diluído cinco vezes para a ser utilizado nas reações de qPCR e armazenado a -20°C.

### **3.8.3 qPCR (PCR quantitativa em tempo real)**

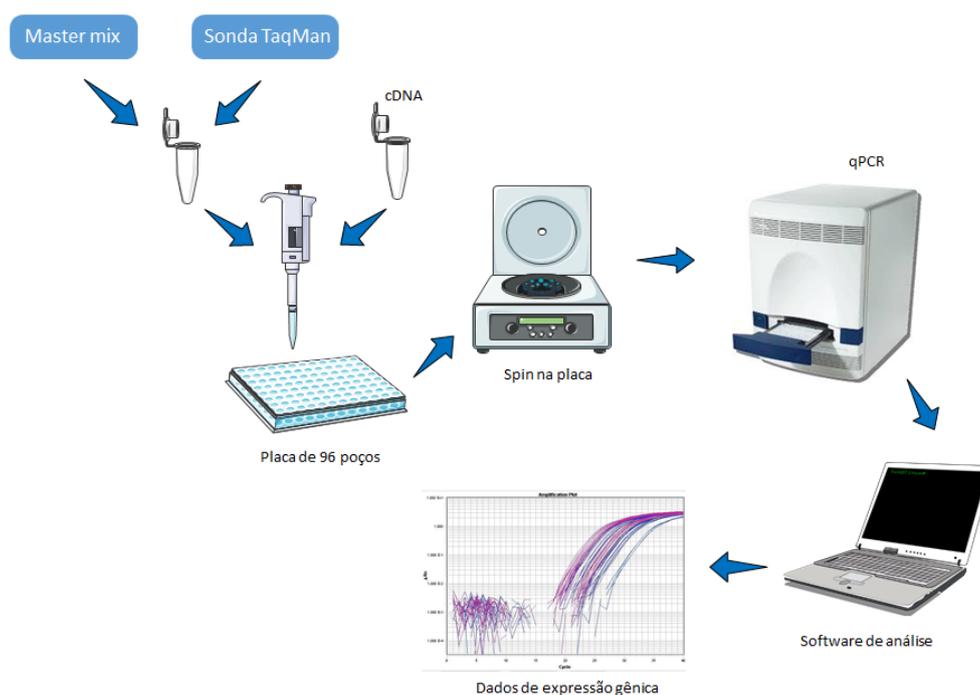
As reações foram realizadas no aparelho 7500 Fast Real-Time PCR System® (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA), em placas transparentes de 96 poços (*MicroAmp 96-well Plates*, *Applied Biosystems*, Inc., Foster City, CA, USA). As reações de PCR em tempo real foram realizadas em duplicata utilizando sondas *TaqMan assay*® com marcação FAM-MGB pela Applied Biosystems (Tabela 4). A representação esquemática da metodologia utilizada na análise de expressão gênica encontra-se na figura 8. O volume final de cada reação foi de 10µl, sendo 7µl de TaqMan Universal, 0,5µl de primer (*TaqMan Assay*) e 2,5µl de cDNA. As condições de termociclagem compreenderam uma incubação a 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos (para ativação da DNA polimerase), seguidos por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos (desnaturação) e 60°C por 1 minuto (anelamento e extensão simultâneos).

**Tabela 1: Sondas utilizadas na avaliação da expressão gênica por PCR em Tempo Real**

GENES	CÓDIGO DE REFERÊNCIA (Applied Biosystems)
<b>Genes Normalizadores</b>	
UBC ( <i>Ubiquitina C</i> )	Hs00824723_m1
B2M ( <i>β2-Microglobulina</i> )	Hs99999907_m1
GAPDH ( <i>Gliceraldeído fosfato desidrogenase</i> )	Hs02786624_g1
<b>Genes de Estudo</b>	
AURKA ( <i>Aurora kinase A</i> )	Hs01582072_m1
AURKB ( <i>Aurora kinase B</i> )	Hs00945858_g1
MAD2 ( <i>Mitotic arrest defective</i> )	Hs01554513_g1
CDC20 ( <i>Cell division cycle 20</i> )	Hs00426680_mH
CDKN1A ( <i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A</i> )	Hs0035782_m1

Todas as amostras (casos, controles normais e controle interno das reações) foram realizadas em duplicatas. Uma amostra calibradora quantitativa foi incluída em todas as placas de qPCR (*pool* de duas linhagens celulares oriundas de tumores humanos, disponibilizada pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - FMRP/USP) para minimizar as diferenças de amplificação entre as reações. Como controle de contaminantes da PCR, foram utilizados NTCs (*no-templante controls*) adicionando-se água no lugar do cDNA, em cada placa. A representação da metodologia da expressão gênica por qPCR encontra-se na figura 8.

**Figura 8:** Representação esquemática dos procedimentos de expressão gênica por qPCR.



Para validar a estabilidade dos níveis de expressão gênica, foram utilizados três genes de referência:  $\beta 2$ -microglobulina (*B2M*), Ubiquitina C (*UBC*) e Gliceraldeído fosfato desidrogenase (*GAPDH*). Para a escolha do par de genes de referência mais estáveis, foi calculado o desvio padrão de cada gene de referência com base em valores brutos (*Cq - quantification cycle*). Entende-se como gene endógeno mais estável, aquele ou aqueles que obtiverem o menor valor de desvio padrão. Após a análise do desvio padrão, foi realizado um cálculo de coeficiente de correlação de Pearson para cada par de genes de referência candidatos. Em seguida, foi feita a média geométrica de todos os genes, conhecida como média de tendência central (INDEX), e feita correlação de Pearson de cada gene, separadamente, com o INDEX obtido. Os genes de referência que apresentaram menor valor de desvio padrão e maior correlação entre si e com o valor INDEX ( $r > 0,7$ ) (VANDESOMPELE et al, 2002), foram considerados os mais estáveis. Assim, para este estudo, obtivemos que os genes mais estáveis nas amostras de cDNA utilizadas foram a *B2M* e o *GAPDH*.

Os resultados foram avaliados através do software *Sequence Detection System v1.3* (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, USA) para obtenção dos valores de *quantitative cycle (Cq)*. A partir do *threshold* estabelecido, os valores de *Cq* foram fornecidos pelo software do aparelho *7500 Real-Time PCR System®* (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, USA). Para normalizar os valores de *Cq*, de forma a considerar diferenças causadas por quantidades distintas de cDNA utilizadas nas reações, o *Cq* determinado para uma amostra foi subtraído da média geométrica dos *Cq's* dos genes de referência utilizados (*B2M* e *GAPDH*)

da mesma amostra, gerando assim os valores de  $\Delta Cq$  e  $2^{-\Delta Cq}$  (LIVAK et al, 2001). A nomenclatura padrão utilizada para os experimentos da PCR quantitativa em tempo real foi baseada no MIQE (*Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*) (BUSTIN et. al., 2009).

Sabe-se que a ocorrência de dados com valores em *outliers* frente as amostras avaliadas em um dado estudo podem interferir na precisão da estimativa correta das análises realizadas. Assim, inicialmente, antes de quaisquer avaliações dos dados para realização de análises estatísticas, a fim de determinar a qualidade, integridade e estabilidade do nível de expressão das amostras dos pacientes avaliadas, foram retiradas do estudo todas as amostras que apresentaram elevados valores de desvio padrão.

### 3.9 Análise Estatística

O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para verificar se os dados de cada variável analisada apresentavam-se com distribuição normal (dados paramétricos) ou não (não paramétricos). Os valores de *outliers* foram retirados (quando ocorreram) por não representarem aqueles resultados aos quais o estudo tinha o objetivo de generalizar (p-valor >0.05 para o teste de Shapiro-Wilk).

Os dados paramétricos foram analisados através do teste *t* de Student, para a comparação da média entre dois grupos, e do teste de ANOVA *one-way*, para a comparação das médias em variáveis com mais de dois grupos. O pós-teste (*post-hoc*) para a ANOVA *one-way* foi definido a partir da análise da homogeneidade de variâncias através do teste de Levene. Caso houvesse homogeneidade de variâncias (p-valor  $\geq 0,05$ ), foi definido como pós-teste para a ANOVA *one-way* o teste de Tukey. Caso não houvesse homogeneidade de variâncias entre os dados (p-valor <0,05), foi definido como pós-teste para a ANOVA *one-way* o teste de Games-Howell.

Os dados não paramétricos foram analisados pelo teste de Man-Whitney, para a comparação da média entre dois grupos, e pelo teste de Kruskal Wallis, seguido do pós-teste (*post-hoc*) de Dunn's.

Os testes de correlação de *Pearson* (dados com distribuição não paramétrica) foram utilizados para a obtenção do valores de *r* e *r-square* ( $r^2$ ) que demonstram a influência do nível de expressão de um dado gene sobre o outro na população avaliada buscando demonstrar se tais genes são regulados pelo mesmo mecanismo molecular. Foram consideradas forte, moderada e fraca as correlações quando os coeficientes de correlação (*r*)

se apresentaram entre os valores (0,1-0,3), (0,31-0,5) e (>0,5) respectivamente (COHEN, 1988).

Os dados sobre o nível de expressão gênica (valores de  $\Delta Cq$ ) foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão (SD), com intervalo de confiança (CI) (máximo e mínimo), a fim de determinar a possível associação entre o nível de expressão dos genes frente cada variável analisada. O nível de significância estatística utilizado foi de  $p < 0,05$  e todas as análises foram efetuadas com recurso do software SPSS para Windows (versão 20.0).

#### **4.0 Variáveis analisadas**

As variáveis analisadas neste estudo foram assim subdivididas:

- Grupos: Grandes Produtores, Agricultura familiar e Agricultura Ecológica
- Tabagismo: sim e não;
- Etilismo: sim e não;
- Tipo de Pesticida Utilizado: Glifosato, Paraquat, Organofosforado, Herbicida
- Número de Agrotóxicos utilizados: 1, 2, 3 ou 4
- Tipo de Contato: Direto, quando os agricultores tinham contato direto na preparação ou pulverização dos agrotóxicos ou Indireto, quando os agricultores apenas entravam na plantação após a pulverização realizada no dia anterior.
- Tempo de Exposição em anos: 1 a 10; 11 a 20; 21 a 30; 41 a 50;
- Cariótipo: Normal e Alterado
- Hemograma

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Caracterização dos agricultores

O número amostral deste estudo (n) foi igual a 95 agricultores estratificados em 3 distintos grupos (com seus respectivos número amostral): grande produtores, com um total de 52 indivíduos, grupo de agricultura familiar, com 33 indivíduos e, por fim, 10 indivíduos correspondentes do grupo de agricultura ecológica (Tabela 2). Quanto às variáveis sócio-demográficas, observou-se que, todos os indivíduos avaliados foram do gênero masculino com média de idade 37,63 anos (20 - 60), 45,70 anos (28 - 65) e 42 anos (28 - 56), respectivamente para os grupos de grande produtor, agricultura familiar e agricultura ecológica (Tabela 2). Destaca-se que há diferenças entre as idades dos agricultores entre os grupos, mostrando que indivíduos do grupo de grande agricultura são mais jovens que os indivíduos de agricultura familiar ( $p=0,005$ , pós-teste de *Dunn's*). Em relação aos perfil etilista e tabagista dos agricultores, destaca-se que, para todos os grupos, há o predomínio de casos que não consomem álcool e tabaco (Tabela 2).

Estratificando os casos quanto aos tipos de agrotóxicos, vê-se que, para os grupos de grandes produtores e de agricultura familiar, respectivamente, houve um predomínio de casos que utilizaram agrotóxicos do tipo organofosforado (25 (50,0%) / 28 (96,6%)), seguido de herbicidas (19 (36,5%) / 24 (72,7%)), glifosato (9 (17,3%) / 8 (24,2%)) e paraquat (6 (66,7%) / 3 (9,1%)) (Tabela 2). Nesta análise, observou-se que há um aumento da razão de chances de os indivíduos de agricultura familiar utilizarem agrotóxicos do tipo organofosforados ( $p=0.002$ ; OR=28.000; IC= 3.532 - 221.952) e herbicidas ( $p=0.002$ ; OR=4.491; IC= 1.731 - 11.653) em comparação aos grandes produtores (Tabela 2). Destaca-se que, em ambos os grupos de agricultores avaliados, predominou-se o uso de 2 tipos de agrotóxicos, com contato do tipo indireto (ar e água, por exemplo) e com tempo de exposição entre 1 a 20 anos (Tabela 2).

Por fim, quanto aos aspectos hematológicos, não foram identificadas diferenças significativas entre os grupos de grande produtores, de agricultura familiar e ecológica e os achados hematológicos, exceto para a contagem de linfócitos (Tabela 2), na qual demonstrou-se que agricultores grandes produtores apresentam contagem de linfócitos inferior aos valores observados em indivíduos de agricultura ecológica ( $p=0,048$ , pós-teste de *Dunn's*) (Tabela 2).

**Tabela 2.** Características clínicas e sócio demográficas dos agricultores.

Variáveis	Grande Produtor (n=52) Média (Faixa)	Agricultura Familiar (n=33) Média (Faixa)	Agricultura Ecológica (n=10) Média (Faixa)	p-valor
<b>Idade (anos)<sup>a</sup></b>	37,63 (20-60)	45,70 (28-65)	42,00 (28 - 56)	<b>0.004</b>
<b>Tabagismo<sup>b</sup></b>				
Sim	10 (19,2)	3 (9,1)	2 (13,3)	0.505
Não	42 (80,7)	30 (90,9)	8 (10,0)	
<b>Etilismo<sup>b</sup></b>				
Sim	2 (3,8)	3 (9,1)	1 (10,0)	0.460
Não	50 (96,2)	30 (90,9)	9 (90,0)	
<b>Tipos de Pesticidas</b>				
<b>Glifosato<sup>b</sup></b>				
Sim	9 (17,3)	8 (24,2)	-	0.579
Não	43 (82,7)	25 (75,8)	-	
<b>Paraquat<sup>b</sup></b>				
Sim	6 (11,5)	3 (9,1)	-	1.000
Não	46 (88,4)	30 (90,9)	-	
<b>Organofosforado<sup>b</sup></b>				
Sim	25 (50,0)	28 (96,6)	-	<0.000
Não	25 (50,0)	1 (3,4)	-	
<b>Herbicida<sup>a,b</sup></b>				
Sim	19 (36,5)	24 (72,7)	-	<b>0.002</b>
Não	<b>33</b> (63,4)	9 (27,3)	-	
<b>Número de agrotóxicos<sup>b</sup></b>				
1	7 (23,3)	9 (28,1)	-	0.887
2	18 (60,0)	16 (50,0)	-	
3	4 (13,3)	6 (18,8)	-	
4	1 (3,3)	1 (3,1)	-	
<b>Tipo de Contato<sup>b</sup></b>				
Direto	18 (34,6)	15 (45,5)	-	0.365
Indireto	34 (65,4)	18 (54,5)	-	
<b>Tempo de exposição (anos)<sup>b</sup></b>				
1 a 10	20 (38,5)	4 (12,1)	-	<b>0.005</b>
11 a 20	20 (38,5)	10 (30,3)	-	
21 a 30	6 (11,5)	6 (18,2)	-	
31 a 40	5 (9,6)	7 (21,2)	-	
41 a 50	1 (1,9)	6 (18,2)	-	
<b>Hemoglobina (g/dL) <sup>a</sup></b>	15,23 (12,00 - 17,50)	14,83 (16,60 - 12,80)	15,29 (16,90 - 14,10)	0.465
<b>Neutrófilos (x 10L<sup>-1</sup>) <sup>a</sup></b>	527.11 (217-1075)	2185.55 (144-7429)	4077 (5915 - 1750)	0.826
<b>Eosinófilos <sup>a</sup></b>	4426,37 (7540 - 2016)	4203,86 (7488 - 2622)	225,30(400 -126)	0.400
<b>Linfócitos <sup>a</sup></b>	1921,84 (3480 - 1050)	1960,62 (3185 - 1122)	2479,20 (3520 - 1700)	<b>0.048</b>
<b>Monócitos <sup>a</sup></b>	345,19 (784 - 168)	373,33 (720 - 180)	394,50 (664 - 192)	0.642
<b>Plaquetas (mm<sup>3</sup>) <sup>a</sup></b>	242906,25 (403000 - 136000)	247714,29 (325000 - 162000)	230000,00 (313000 - 139000)	0.684

**VCM** (volume corpuscular médio), **HCM** (hemoglobina corpuscular média), **RDW** (Red Cell Distribution Width), **WBC** (diferencial de glóbulos brancos), **ANC** (Contagem de neutrófilos).

\*Há um caso sem informação.

<sup>a</sup> Teste de Kruskal Wallys seguido do post-hoc de Dunn's.

<sup>b</sup> Teste de qui-quadrado exato de Fisher (2x2) ou de Pearson seguido de Regressão Logística Multinomial

Texto em negrito apresentando resultado de significancia em p<0.05.

## 4.2 Análises citogenéticas clássica por banda G em amostras de medula óssea dos agricultores expostos ou não à agrotóxicos

No presente estudo, foi realizada a avaliação de anormalidades cromossômicas em células da medula óssea dos 95 agricultores submetidos neste estudo pela técnica de citogenética por banda G. Dentre os 95 casos, realizamos análise citogenética de 33 (34,7%) casos.

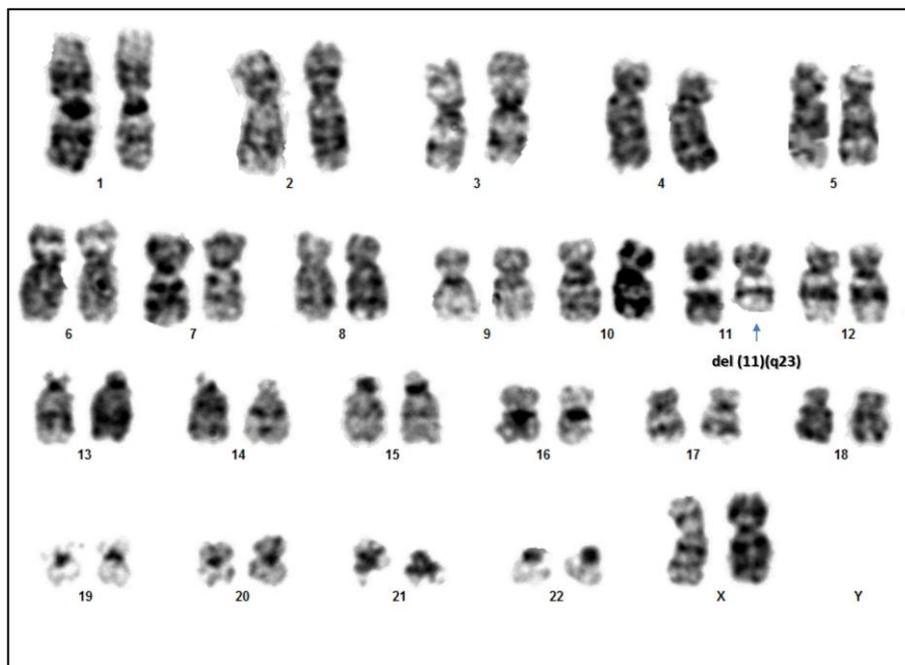
Dentre os casos com resultado citogenético, identificou-se 23 (69,7%) casos de agricultores com resultado citogenético normal e 10 (30,3%) casos de agricultores com resultado citogenético alterado (Tabela 3) (Figuras 8, 9, 10 e 11). Em relação aos agricultores com resultado citogenético alterado, observam-se casos de agricultores com resultados citogenéticos alterados apenas nos grupos expostos a agrotóxicos (Agricultura Familiar - 2 casos; Grandes produtores - 8 casos) (Tabela 3). Destaca-se que as principais alterações citogenéticas encontradas estão relacionadas à presença de aneuploidias (4 casos), hiperdiploidias (2 casos), deleções (5 casos) e cromossomos adicionais (2 casos) (Tabela 3).

**Tabela 3:** Caracterização dos agricultores pelo resultado citogenético.

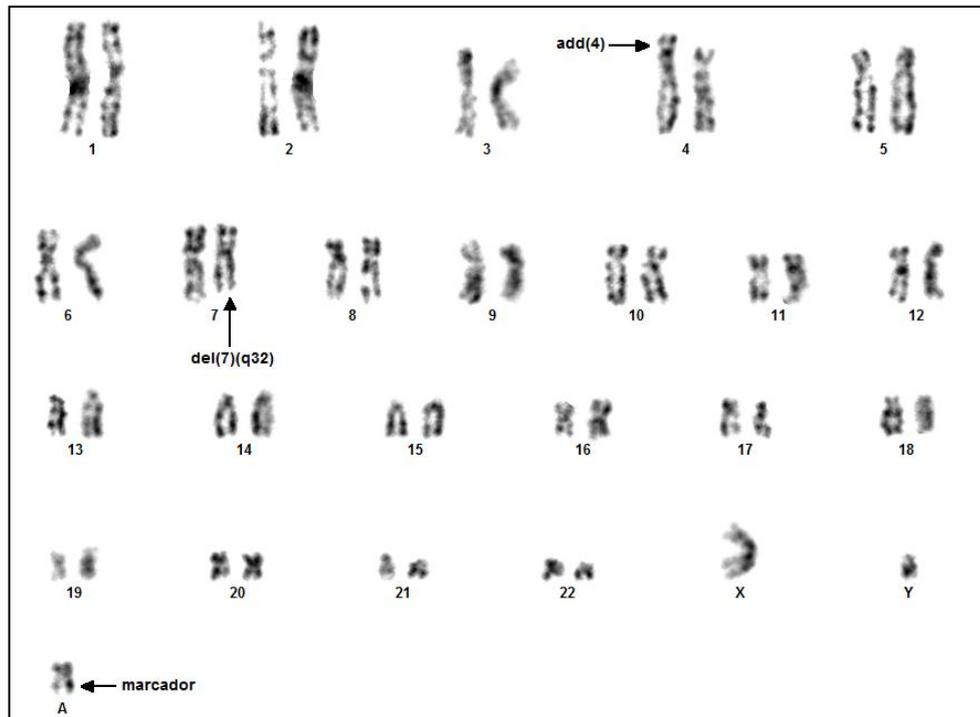
Caso	Grupo	Cariótipo	Resultado
1	ECOLOGICA	46,XY [10]	Normal
2	AGRICULTURA FAMILIAR	18~35,XY,-4,-5,-8,-9,-11,-16,-17,-19	Aneuploidia
3	AGRICULTURA FAMILIAR	20~30,+1,+14,+16,+18,+21,+22[5]/45,X	Aneuploidia
4	GRANDE PRODUTOR	25,+4[3]/33,+1,+2,+5,+10,+16,+17,+18	Aneuploidia
5	GRANDE PRODUTOR	32~45,-1,-18,-7,-14,-16[cp9]	Aneuploidia
6	GRANDE PRODUTOR	44,-20,-21[8]/46,XY[2]	Aneuploidia
7	GRANDE PRODUTOR	46, XY [10]	Normal
8	ECOLOGICA	46, XY [4]	Normal
9	GRANDE PRODUTOR	46,XX,del(18)(p11.21)[4]/46,XX[22]	Deleção
10	GRANDE PRODUTOR	46,XY [15]	Normal
11	GRANDE PRODUTOR	46,XY,add(4)(?q35)[3]/46,XY[16]	Adicional
12	GRANDE PRODUTOR	46,XY,del(11)(q23)[3]/46,XY[17]	Deleção
13	GRANDE PRODUTOR	46,XY,del(11)(q23)[4]/46,XY[16]	Deleção
14	ECOLOGICA	46,XY[10]	Normal
15	AGRICULTURA FAMILIAR	46,XY[10]	Normal
16	GRANDE PRODUTOR	46,XY[10]	Normal
17	GRANDE PRODUTOR	46,XY[10]	Normal
18	GRANDE PRODUTOR	46,XY[11]	Normal
19	GRANDE PRODUTOR	46,XY[15]	Normal
20	AGRICULTURA FAMILIAR	46,XY[15]	Normal
21	ECOLOGICA	46,XY[17]	Normal

22	GRANDE PRODUTOR	46,XY[20]	Normal
23	GRANDE PRODUTOR	46,XY[20]	Normal
24	AGRICULTURA FAMILIAR	46,XY[20]	Normal
25	GRANDE PRODUTOR	46,XY[20]	Normal
26	ECOLOGICA	46,XY[20]	Normal
27	ECOLOGICA	46,XY[25]	Normal
28	GRANDE PRODUTOR	46,XY[26]	Normal
29	AGRICULTURA FAMILIAR	46,XY[7]	Normal
30	GRANDE PRODUTOR	46,XY[7]	Normal
31	AGRICULTURA FAMILIAR	46,XY[7]	Normal
32	ECOLOGICA	46,XY[7]	Normal
33	GRANDE PRODUTOR	46~47,XY,add(4)(p16),del(7)(q32),+ma	Adicional/deleção

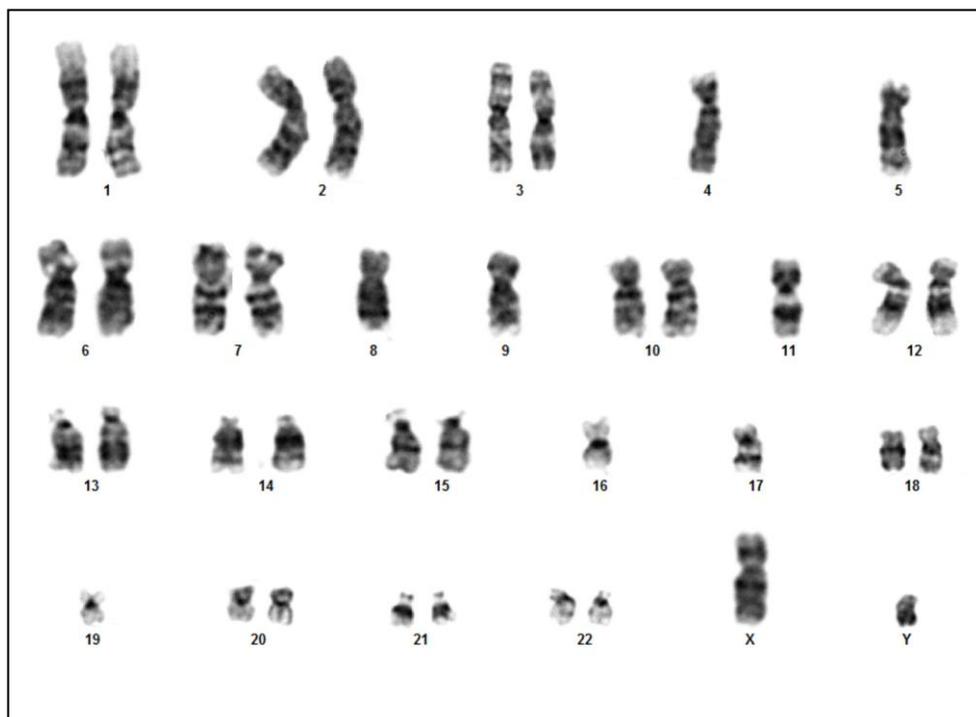
**Figura 9:** Caso 12 revela deleção do braço longo do cromossomo 11.



**Figura 10:** Caso 32 revela deleção do braço longo do cromossomo 7 e material adicional no cromossomo 4, além da presença de um cromossomo marcador.



**Figura 11:** Caso 2 revela hipodiploidia.



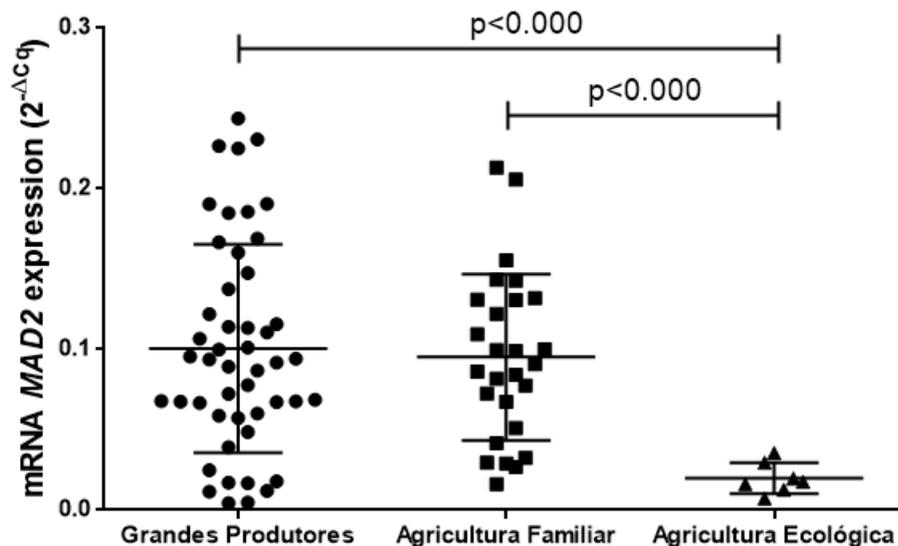
### 4.3 Análise do nível de expressão gênica por qPCR em amostras de *pool* celular dos agricultores expostos ou não a agrotóxicos

Os níveis de expressão gênica referente aos genes *AURKA*, *AURKB*, *MAD2*, *CDC20* e *CDKN1A* para a associação entre os indivíduos do grupo de grande produtores (n= 52), grupo de agricultura familiar (n=33) e, por fim, do grupo de agricultura ecológica (n=10), e suas respectivas variáveis clínicas, serão apresentados nas seções a seguir (Tabela 4).

#### 4.3.1 Análise do nível de expressão do gene *CDC20*

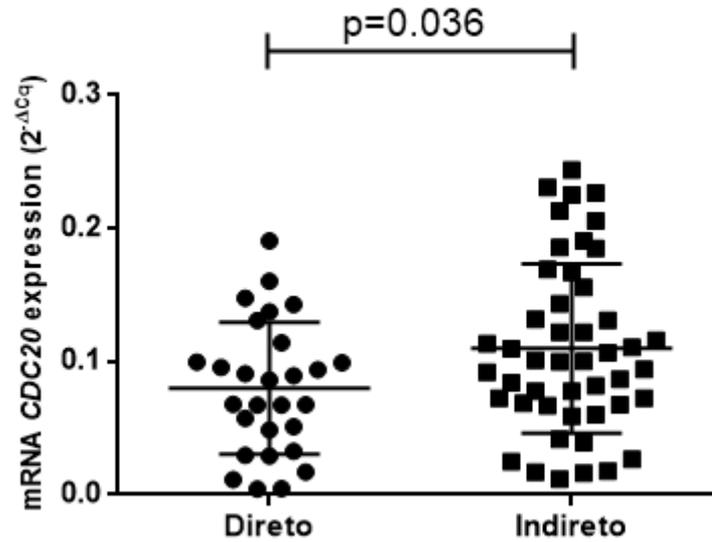
Destaca-se neste estudo que foram obtidas fortes e importantes associações entre o nível de expressão do gene *CDC20* e as variáveis de grupo de exposição, tipo de exposição a agrotóxicos e uso dos tóxicos paraquat e organofosforados (Tabela 4). Baseando-se no teste de ANOVA one-way seguido do *post-hoc* teste de Games-Howell ( $p=0.004$ ), quanto à variável grupo de exposição, foi identificado que agricultores grandes produtores ( $p<0.000$ ) e de cultivo familiar ( $p<0.000$ ) (ambos utilizam agrotóxicos nas colheitas) apresentam um aumento de expressão de *CDC20* quando comparados a agricultores de cultivo ecológico ( $p=0.049$ ) (Figura 12).

**Figura 12:** Nível de expressão do gene *CDC20* em relação aos grupos.



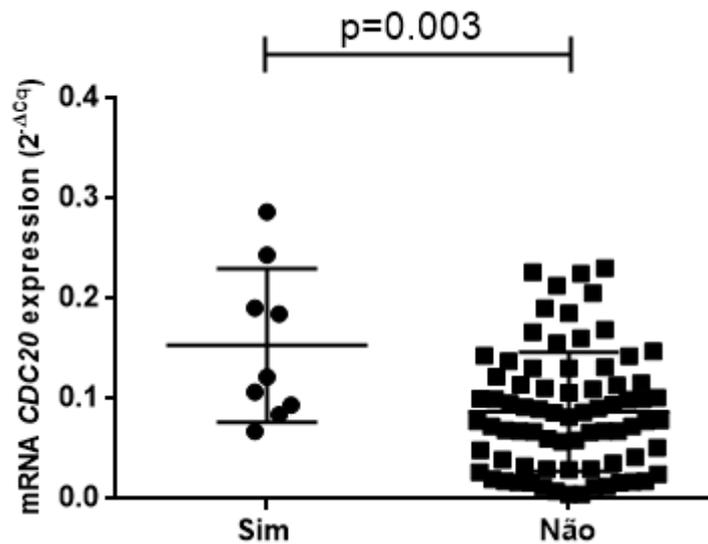
Além deste achado, foi observado que agricultores que fazem uso de agrotóxico com contato indireto com o tóxico apresentam um aumento de expressão de *CDC20* em relação a agricultores que fazem uso de agrotóxicos de forma direta ( $p=0.036$ ) (Figura 13).

**Figura 13:** Nível de expressão do gene *CDC20* em relação ao tipo de exposição ao agrotóxico.

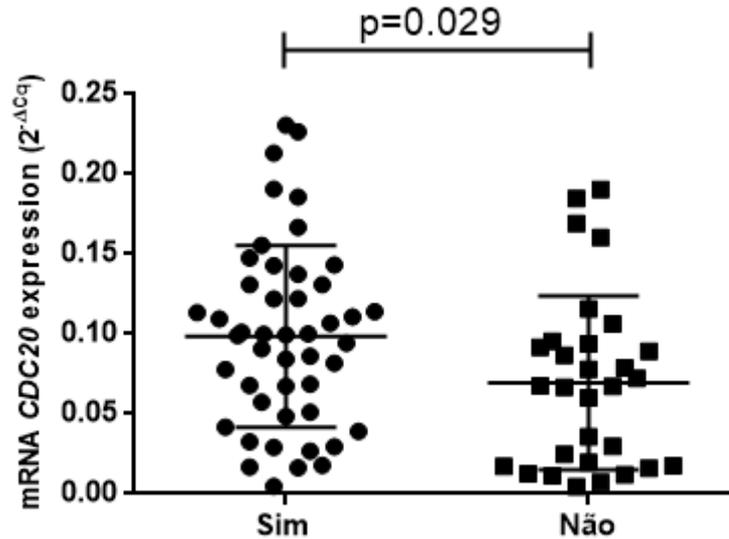


Por último, pôde-se observar que pacientes que utilizam os agrotóxicos do tipo Paraquat ( $p=0.003$ ) (Figura 14) e Organofosforados ( $p=0.029$ ) (Figura 15) apresentam um aumento de expressão do gene *CDC20* quando comparados aos agricultores que não utilizam esses tóxicos no seu cultivo.

**Figura 14:** Nível de expressão do gene *CDC20* em relação ao uso de Paraquat.



**Figura 15:** Nível de expressão do gene *CDC20* em relação ao uso de Organofosforado.

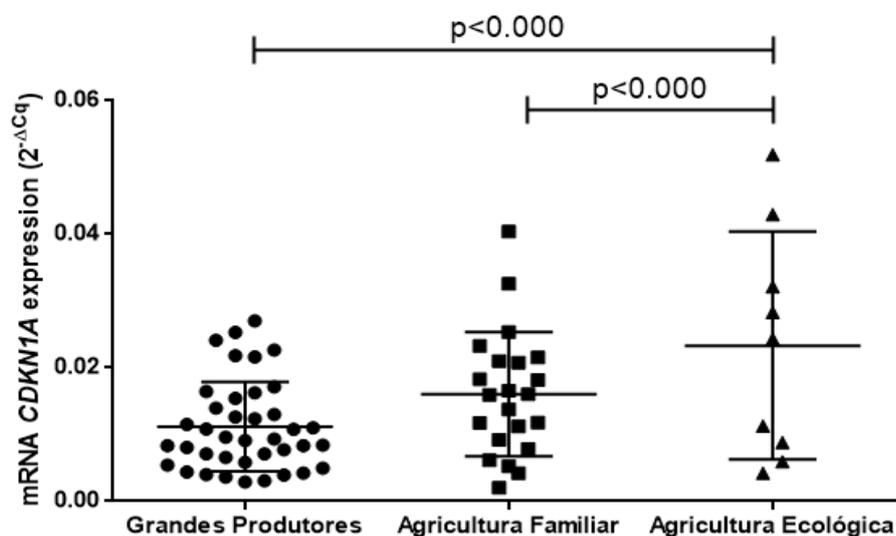


Não foram encontradas significâncias nas análises de associação da expressão de *CDC20* para as variáveis de etilismo, tabagismo, tempo de exposição, uso de glifosato, uso de herbicida, número de pesticidas utilizados e cariótipo ( $p > 0.05$ ) (Tabela 4).

#### 4.3.2 Análise do nível de expressão do gene *CDKN1A*

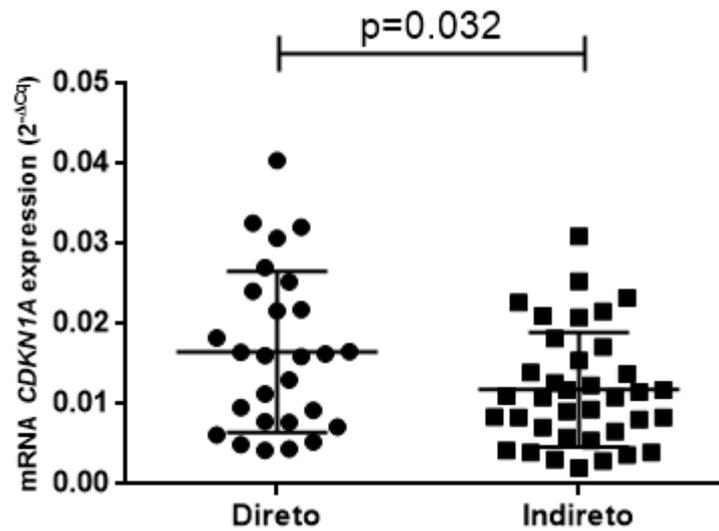
Os resultados da presente pesquisa evidenciaram que o perfil de expressão do gene *CDKN1A* esteve associado com as variáveis de grupo de exposição, tipo de exposição e uso de agrotóxicos do tipo Paraquat, Organofosforados e Herbicidas (Tabela 4). Inicialmente, observou-se que, pelo teste de ANOVA one-way seguido do *post-hoc* teste de Games-Howell ( $p = 0.004$ ), indivíduos de grande produção e agricultura familiar apresentam uma diminuição da expressão do gene *CDKN1A* quando comparados a agricultores de cultivo ecológico ( $p < 0.000$ ) (Figura 16).

**Figura 16:** Nível de expressão do gene *CDKN1A* em relação aos grupos.



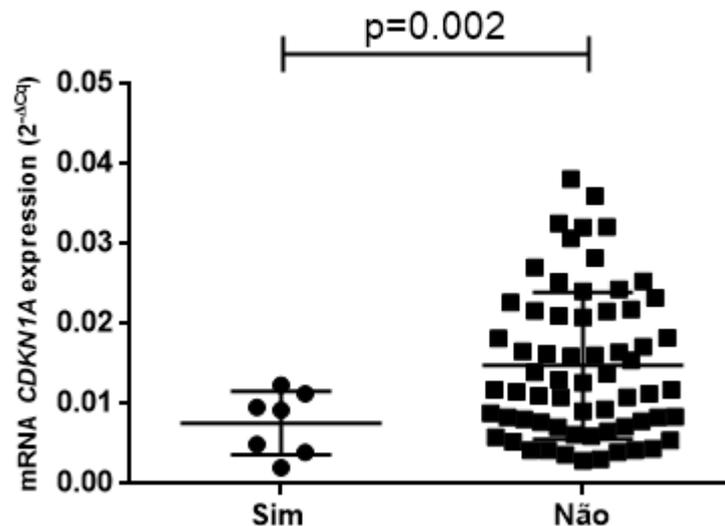
Foi demonstrado, também, que indivíduos que apresentam exposição indireta a agrotóxicos demonstram uma diminuição de expressão de *CDKN1A* quando comparados a agricultores que se expõem indiretamente aos tóxicos ( $p=0.032$ ) (Figura 17).

**Figura 17:** Nível de expressão do gene *CDKN1A* em relação ao tipo de exposição ao agrotóxico.



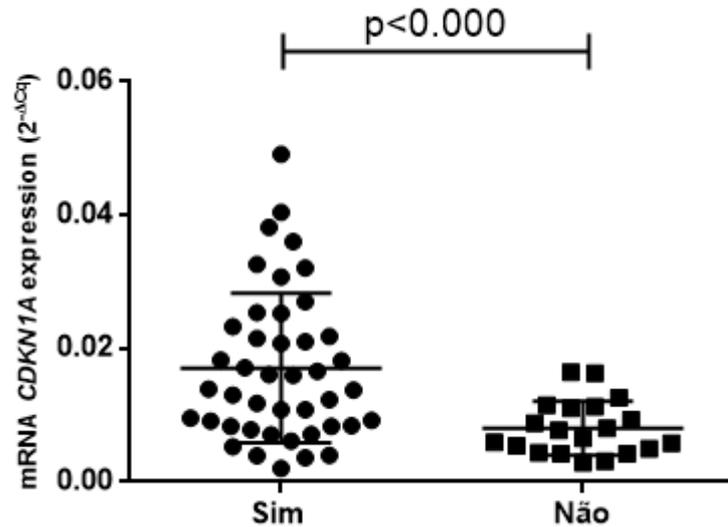
Verificou-se, também, que agricultores que utilizam Paraquat apresentam uma diminuição da expressão de *CDKN1A* em relação a indivíduos que não utilizam este tóxico ( $p=0.002$ ) (Figura 18).

**Figura 18:** Nível de expressão do gene *CDKN1A* em relação ao uso de Paraquat.

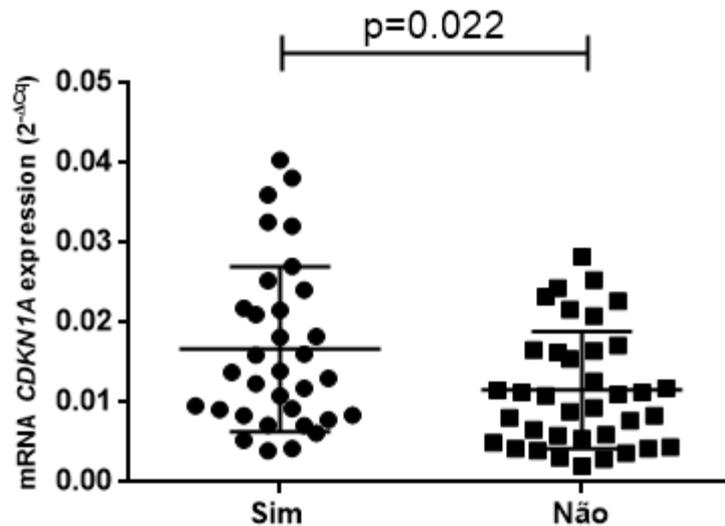


Contrariamente, verificou-se que agricultores que utilizaram agrotóxicos do tipo Organofosforados ( $p < 0.000$ ) (Figura 19) e Herbicidas ( $p = 0.022$ ) (Figura 20) apresentam expressão aumentada do gene *CDKN1A* quando comparados a indivíduos que não utilizaram estes tóxicos.

**Figura 19:** Nível de expressão do gene *CDKN1A* em relação ao uso de Organofosforado.



**Figura 20:** Nível de expressão do gene *CDKN1A* em relação ao uso de Herbicidas.

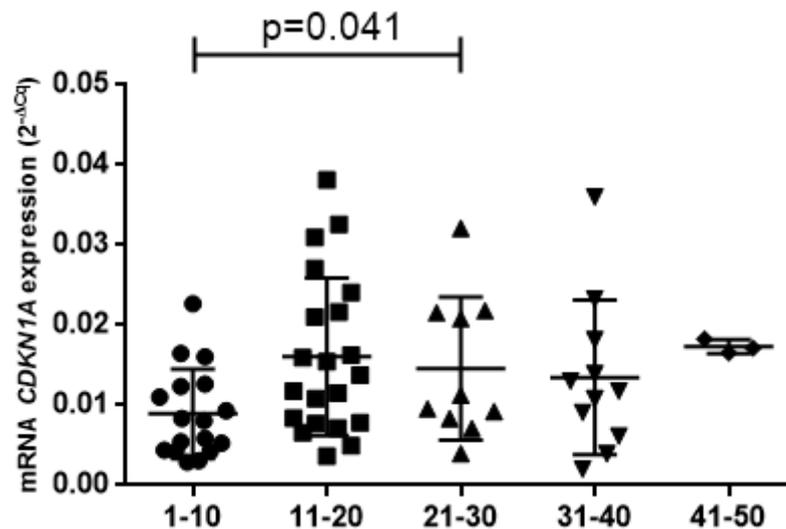


Não foram encontradas significâncias nas análises de associação da expressão de *CDKN1A* para as variáveis de etilismo, tabagismo, tempo de exposição, uso de glifosato número de pesticidas utilizados e cariótipo ( $p > 0.05$ ) (Tabela 4).

### 4.3.3 Análise do nível de expressão do gene *AURKA*

Na presente pesquisa, identificamos que o perfil de expressão do gene *AURKA* esteve associado com o tempo de exposição dos agricultores aos agrotóxicos utilizados, seja no grupo de grande produtores ou em agricultura familiar (Tabela 4). Nesta análise, identificamos, pelo teste de ANOVA one-way seguido do *post-hoc* teste de Games-Howell ( $p=0.022$ ), que agricultores com 21 a 30 anos de exposição a agrotóxicos apresentam um aumento de expressão do gene *AURKA* quando comparados a agricultores expostos entre 1 a 10 anos à agrotóxicos ( $p=0.041$ ) (Figura 21).

**Figura 21:** Nível de expressão do gene *AURKA* em relação ao tempo de exposição dos agricultores expostos à agrotóxicos.

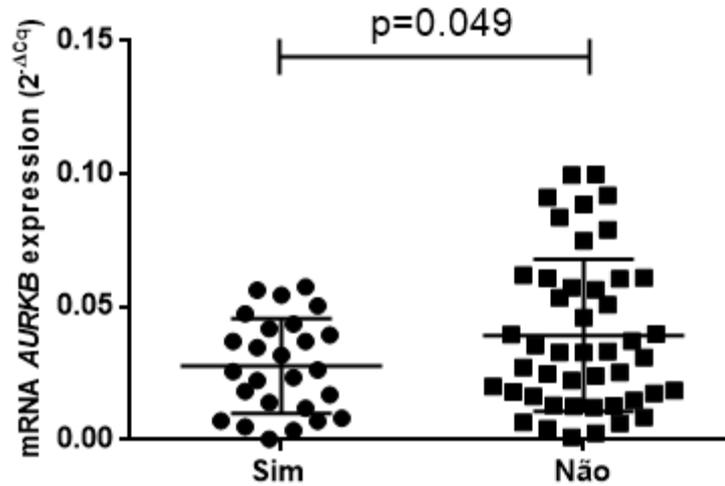


Não foram encontradas significâncias nas análises de associação da expressão de *MAD2* para as variáveis de grupo, tabagismo, etilismo, tipo de exposição, uso de glifosato, uso de paraquat, uso de organofosforado, uso de herbicida, número de pesticidas utilizados e cariótipo ( $p>0.05$ ) (Tabela 4).

### 4.3.4 Análise do nível de expressão do gene *AURKB*

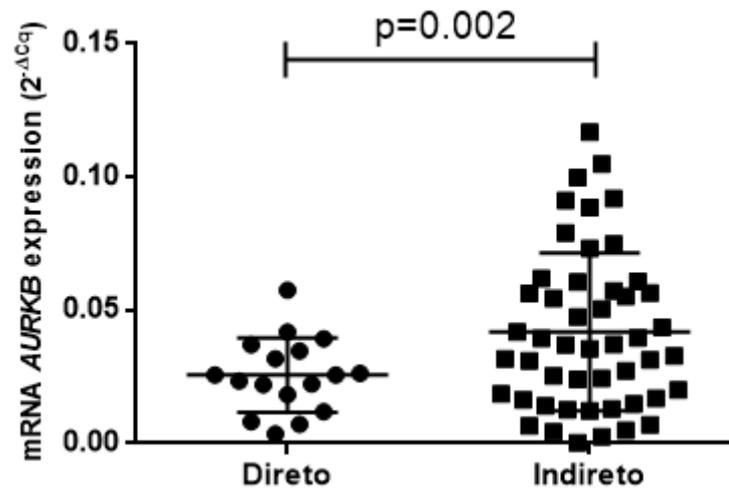
Para o gene *AURKB*, encontramos associações significantes entre seu perfil de expressão com relação às variáveis de uso de herbicida e tipo de exposição. Inicialmente, quanto à associação do nível de expressão do gene *AURKB* e o uso de agrotóxico do tipo herbicida, identificou-se que o gene *AURKB* está com expressão diminuída em agricultores que utilizaram herbicidas frente aos indivíduos que não utilizaram ( $p=0.049$ ) (Figura 22).

**Figura 22:** Nível de expressão do gene *AURKB* em relação ao uso de Herbicidas por agricultores expostos à agrotóxicos.



Posteriormente, observou-se que agricultores que possuem exposição indireta ao agrotóxico apresentam, também, um aumento da expressão de *AURKB* quando comparado a agricultores com exposição indireta aos agrotóxicos ( $p=0.002$ ) (Figura 23).

**Figura 23:** Nível de expressão do gene *AURKB* em relação ao tipo de exposição ao agrotóxico.

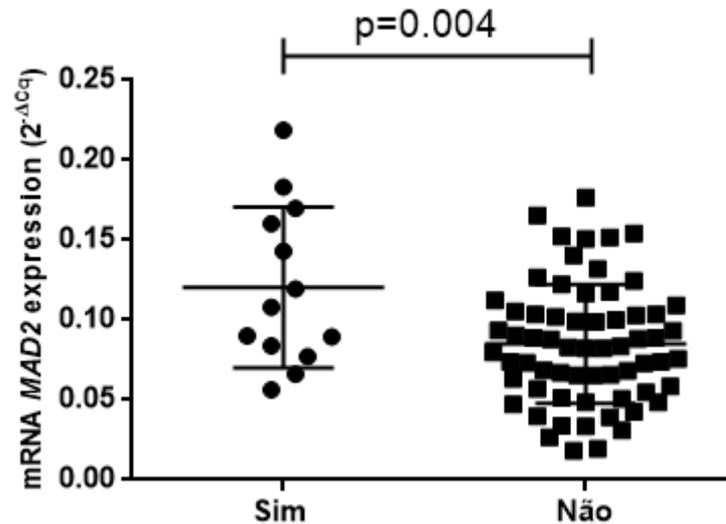


Não foram encontradas significâncias nas análises de associação da expressão de *AURKB* para as variáveis de grupo, tabagismo, etilismo, tempo de exposição, uso de glifosato, uso de paraquat, uso de organofosforado, número de pesticidas utilizados e cariótipo ( $p>0.05$ ) (Tabela 4).

#### 4.3.5 Análise do nível de expressão do gene *MAD2*

No presente estudo, verificou-se que o perfil de expressão do gene *MAD2* apresentou-se diferenciado quanto à análise da variável tabagismo (Tabela 4). Para a variável associada ao consumo de tabaco pelos agricultores foi identificado que indivíduos tabagistas apresentam um aumento de expressão de *MAD2* quando comparados à indivíduos não tabagistas ( $p=0.004$ ) (Figura 24).

**Figura 24:** Nível de expressão do gene *MAD2* em relação ao tabagismo.



Não foram encontradas significâncias nas análises de associação da expressão de *MAD2* para as variáveis de grupo, etilismo, tempo de exposição, tipo de exposição, uso de glifosato, uso de paraquat, uso de organofosforado, uso de herbicida, número de pesticidas utilizados e cariótipo ( $p>0.05$ ) (Tabela 4).

**Tabela 4:** Expressão dos genes *AURKA*, *AURKB*, *MAD2*, *CDC20* e *CDKN1A* em amostras de medula óssea de agricultores.

Variável	Expressão <i>AURKA</i> ( $2^{-\Delta Cq}$ )		Expressão <i>AURKB</i> ( $2^{-\Delta Cq}$ )		Expressão <i>MAD2</i> ( $2^{-\Delta Cq}$ )		Expressão <i>CDC20</i> ( $2^{-\Delta Cq}$ )		Expressão <i>CDKN1A</i> ( $2^{-\Delta Cq}$ )	
Grupo	Média (Range)	P	Média (Range)	p	Média (Range)	P	Média (Range)	P	Média (Range)	p
Grandes Produtores	0.0254 (0.0000-0.0701)		0.0323 (0.0002-0.08855)		0.0896 (0.0266-0.1831)		0.1005 (0.0044-0.2438)		0.0111 (0.0028-0.0270)	
Agric Familiar	0.0311 (0.0036-0.0726)	0.056	0.0296 (0.0043-0.07320)	>0.05	0.0901 (0.0181-0.1698)	>0.05	0.0952 (0.0162-0.2131)	<b>0.004*</b>	0.0160 (0.0020-0.0404)	<b>0.004*</b>
Agric Ecológica	0.0491 (0.0068-0.1228)		0.0738 (0.0062-0.21001)		0.3586 (0.0195-0.8363)		0.0198 (0.0073-0.0356)		0.0233 (0.0042-0.0519)	
<b>Etilismo**</b>										
Sim	0.0209 (0.0008-0.0349)		0.0428 (0.0042-0.0995)		0.0985 (0.0309-0.1698)		0.0905 (0.0114-0.2866)		0.0166 (0.0059-0.0270)	
Não	0.0275 (0.0000-0.0726)	>0.05	0.0316 (0.0002-0.0885)	>0.05	0.0901 (0.0181-0.1893)	>0.05	0.0944 (0.0044-0.2438)	>0.05	0.0127 (0.0020-0.03)	>0.05
<b>Tabagismo**</b>										
Sim	0.0231 (0.0006-0.0425)		0.0380 (0.0049-0.0997)		0.1204 (0.0563-0.2187)		0.1075 (0.0167-0.2866)		0.0199 (0.0028-0.0477)	
Não	0.0278 (0.0000-0.0726)	>0.05	0.0314 (0.0002-0.0885)	>0.05	0.0850 (0.0181-0.0181)	<b>0.004</b>	0.0896 (0.0044-0.2307)	>0.05	0.0139 (0.0020-0.0360)	>0.05
<b>Tempo Exposição (a)</b>										
1-10	0.0215 (0.0000-0.0407)		0.0322 (0.0010-0.0919)		0.1032 (0.0266-0.2427)		0.0968 (0.0044-0.2252)		0.0089 (0.0028-0.0226)	
11-20	0.0325 (0.0006-0.1056)		0.0348 (0.0042-0.0885)		0.0958 (0.0339-0.1831)		0.0978 (0.0114-0.2438)		0.0160 (0.0036-0.0381)	
21-30	0.0364 (0.0211-0.0547)	<b>0.022</b>	0.0415 (0.0036-0.0997)	>0.05	0.1078 (0.0392-0.2187)	>0.05	0.1228 (0.0047-0.2866)	>0.05	0.0145 (0.0040-0.0320)	>0.05
31-40	0.0252 (0.0008-0.0499)		0.0342 (0.0002-0.1049)		0.0919 (0.0399-0.1518)		0.0957 (0.0178-0.2131)		0.0134 (0.0020-0.0360)	
41-50	0.0635 (0.0163-0.1116)		0.0294 (0.0043-0.0911)		0.0609 (0.0181-0.1091)		0.1026 (0.0162-0.2307)		0.0173 (0.0165-0.0182)	
<b>Tipo de Exposição**</b>										
Direta	0.0335 (0.0000-0.0994)		0.0256 (0.0010-0.0575)		0.0884 (0.0266-0.1698)		0.0798 (0.0044-0.1907)		0.0165 (0.0042-0.0404)	
Indireta	0.0252 (0.0006-0.0701)	>0.05	0.0418 (0.0002-0.1168)	<b>0.002</b>	0.0957 (0.0181-0.2187)	>0.05	0.1098 (0.0120-0.2438)	<b>0.036</b>	0.0118 (0.0020-0.0309)	<b>0.032</b>
<b>Glifosato**</b>										
Sim	0.0293 (0.0008-0.0552)		0.0414 (0.0042-0.1168)		0.1043 (0.0655-0.1831)		0.1096 (0.0114-0.2438)		0.0216 (0.0042-0.0538)	
Não	0.0266 (0.0000-0.0726)	>0.05	0.0296 (0.0002-0.0837)	>0.05	0.0878 (0.0181-0.1893)	>0.05	0.0880 (0.0044-0.2307)	>0.05	0.0133 (0.0020-0.0326)	>0.05
<b>Paraquat**</b>										
Sim	0.0355 (0.0011-0.0552)		0.0421 (0.0002-0.0791)		0.1370 (0.0654-0.2496)		0.1533 (0.0674-0.2866)		0.0076 (0.0020-0.0123)	
Não	0.0260 (0.0000-0.0726)	>0.05	0.0294 (0.0010-0.0837)	>0.05	0.0889 (0.0181-0.1893)	>0.05	0.0871 (0.0044-0.2307)	<b>0.003</b>	0.0148 (0.0028-0.0381)	<b>0.002</b>
<b>Organofosforado**</b>										
Sim	0.0281 (0.0006-0.0726)		0.0315 (0.0002-0.0911)		0.0901 (0.0181-0.1766)		0.0985 (0.0047-0.2307)		0.0170 (0.0020-0.0491)	
Não	0.0217 (0.0000-0.0605)	>0.05	0.0375 (0.0010-0.0995)	>0.05	0.0999 (0.0195-0.2427)	>0.05	0.0694 (0.0044-0.1905)	<b>0.029</b>	0.0080 (0.0028-0.0164)	<b>0.000</b>
<b>Herbicida**</b>										
Sim	0.0279 (0.0006-0.072)		0.0290 (0.0002-0.0732)		0.0877 (0.0181-0.1542)		0.0910 (0.0047-0.2056)		0.0166 (0.0039-0.0404)	
Não	0.0250 (0.0000-0.0633)	>0.05	0.0393 (0.0010-0.0997)	<b>0.049</b>	0.1029 (0.0195-0.2427)	>0.05	0.0858 (0.0044-0.2265)	>0.05	0.0115 (0.0020-0.0282)	<b>0.022</b>
<b>Número de Pesticidas</b>										
1	0.0242 (0.0008-0.0548)		0.0330 (0.0042-0.0885)		0.1107 (0.0309-0.2599)		0.1340 (0.0114-0.28)		0.0224 (0.0036-0.0903)	
2	0.0278 (0.0006-0.0552)		0.0324 (0.0036-0.0791)		0.0881 (0.0181-0.1831)		0.0941 (0.0047-0.2438)		0.0307 (0.0020-0.1515)	
3	0.0415 (0.0011-0.1056)	>0.05	0.0285 (0.0002-0.0575)	>0.05	0.1047 (0.0738-0.1507)	>0.05	0.1060 (0.0290-0.1907)	>0.05	0.0248 (0.0039-0.0538)	>0.05
4	0.0304 (0.0211-0.0396)		0.0343 (0.0183-0.0503)		0.1493 (0.0670-0.2316)		0.0947 (0.0674-0.1219)		0.0107 (0.0092-0.0123)	
<b>Cariótipo**</b>										
Normal	0,0267 (0,0009-0,0726)		0,0257 (0,0062-0,0609)		0,0842 (0,0195-0,1429)		0,0766 (0,0073-0,1668)		0,0172 (0,0042-0,0404)	
Alterado	0,0188 (0,0008-0,0397)	>0.05	0,0323 (0,0025-0,0995)	>0.05	0,0830 (0,0333-0,1656)	>0.05	0,0599 (0,0114-0,1221)	>0.05	0,0115 (0,0036-0,0252)	>0.05

Asterisco indica diferença significativa ( $p < 0.05$ ) entre os grupos.

\* Esses dados foram analisados por ANOVA one-way with Games-Howell or Tukey *pos-hoc* test.

\*\* Esses dados foram analisados por *Teste T de Student*.

#### 4.4 Análises de correlação entre os níveis de expressão dos genes relacionados ao fuso mitótico e ponto de checagem mitótica

Para as análises de correlação entre os genes, foi analisada a influência da expressão de cada gene sobre a expressão dos demais a partir da análise do teste de correlação de *Pearson* (R) e obtenção do  $r^2$  (*R square*), a fim de definir a influência que um gene tem sobre o outro, buscando-se caracterizar como se comporta a via de sinalização de controle do fuso mitótico e ciclo celular em agricultores expostos a agrotóxicos (grupo de grande produtores e de agricultura familiar) (Figura 25).

**Figura 25:** Análises de correlações dos níveis de expressão dos genes *AURKA*, *AURKB*, *MAD2*, *CDC20* e *CDKN1A* em agricultores expostos à agrotóxicos.

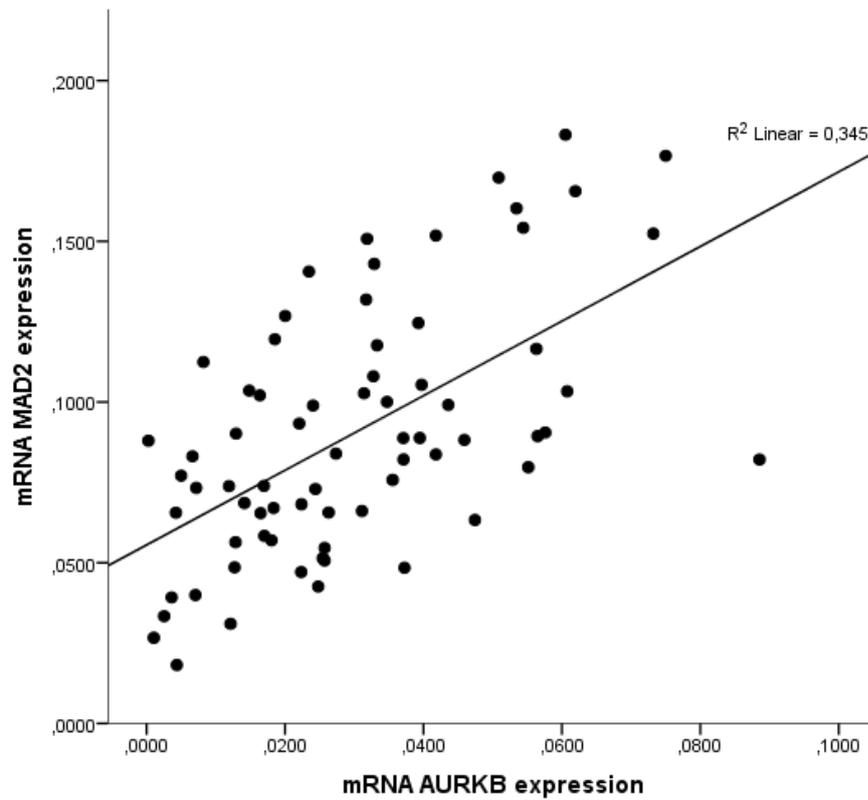
	<i>AURKA</i>	<i>AURKB</i>	<i>MAD2</i>	<i>CDC20</i>	<i>CDKN1A</i>
<i>AURKA</i>		<b>0.000</b>	0.513	0.139	0.081
<i>AURKB</i>	0.520		<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	0.412
<i>MAD2</i>	0.089	0.588		<b>0.000</b>	0.154
<i>CDC20</i>	0.194	0.790	0.520		0.840
<i>CDKN1A</i>	0.241	-,111	-,193	-,027	

p-value (2-tailed)

Pearson's r

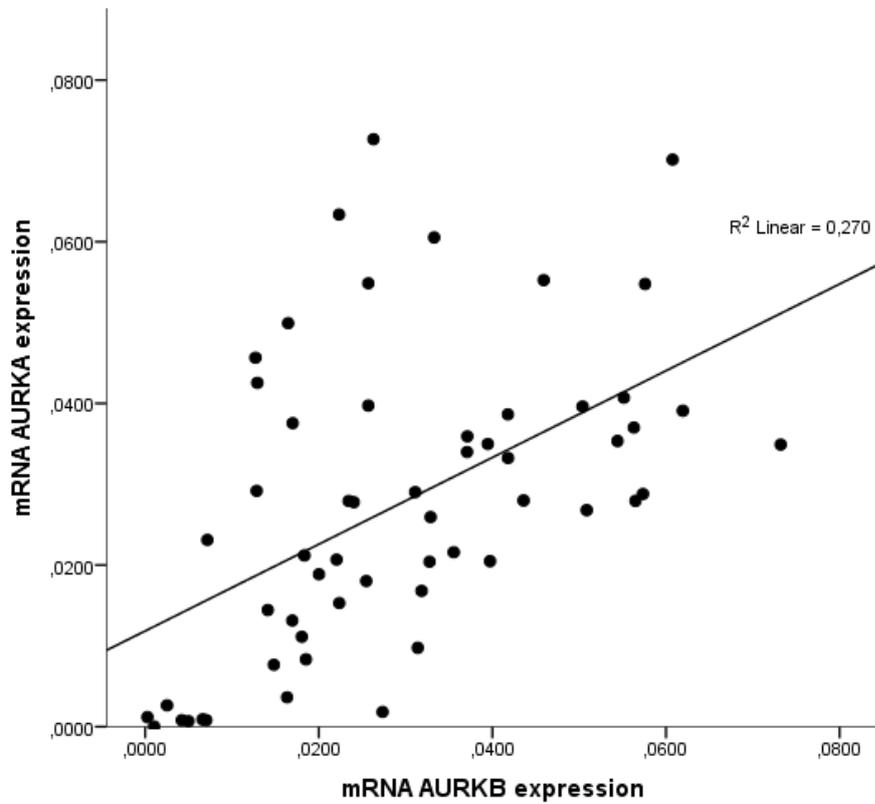
Inicialmente, na análise de correlação de *Pearson*, foi identificado que há uma correlação forte do gene *MAD2* com o gene *AURKB* ( $r=0.588$ ;  $p<0.001$ ), mostrando que estes genes são responsáveis por 34,5% ( $r^2=0.345$ ) da variação dos seus respectivos níveis de expressão em agricultores expostos à agrotóxicos (Figura 26).

**Figura 26:** Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes *MAD2* e *AURKB*.



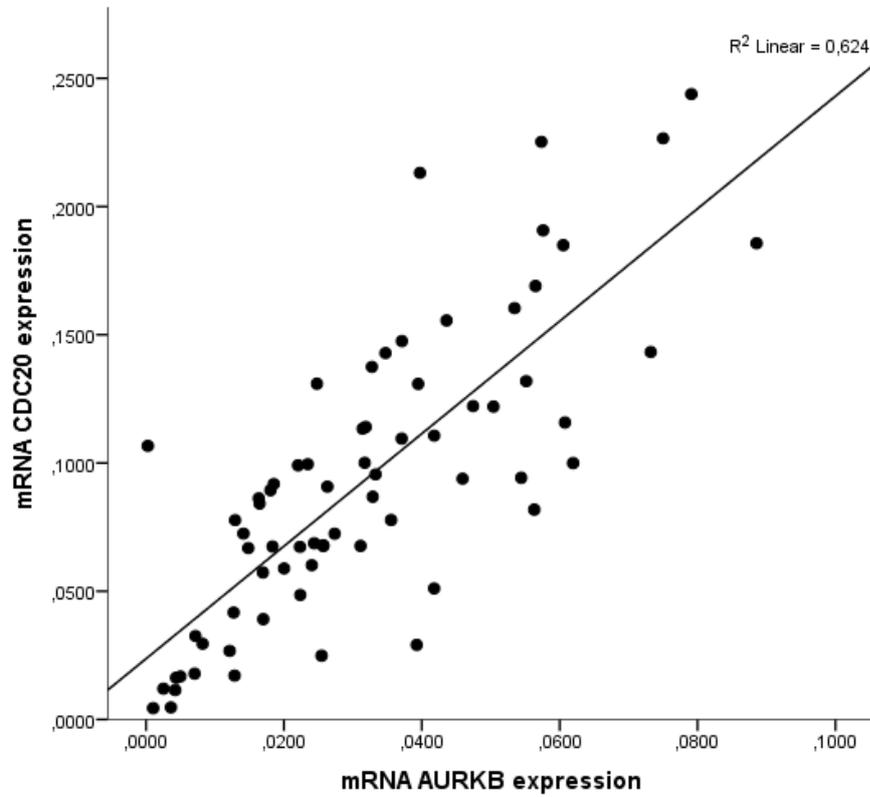
Adicionalmente, observou-se que há uma forte correlação entre o gene *AURKA* e o gene *AURKB* ( $r=0.520$ ;  $p<0.000$ ), demonstrando que estes genes são responsáveis por 27,0% ( $r^2=0.270$ ) da variação dos seus respectivos níveis de expressão em agricultores expostos à agrotóxicos (Figura 27).

**Figura 27:** Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes *AURKA* e *AURKB*.



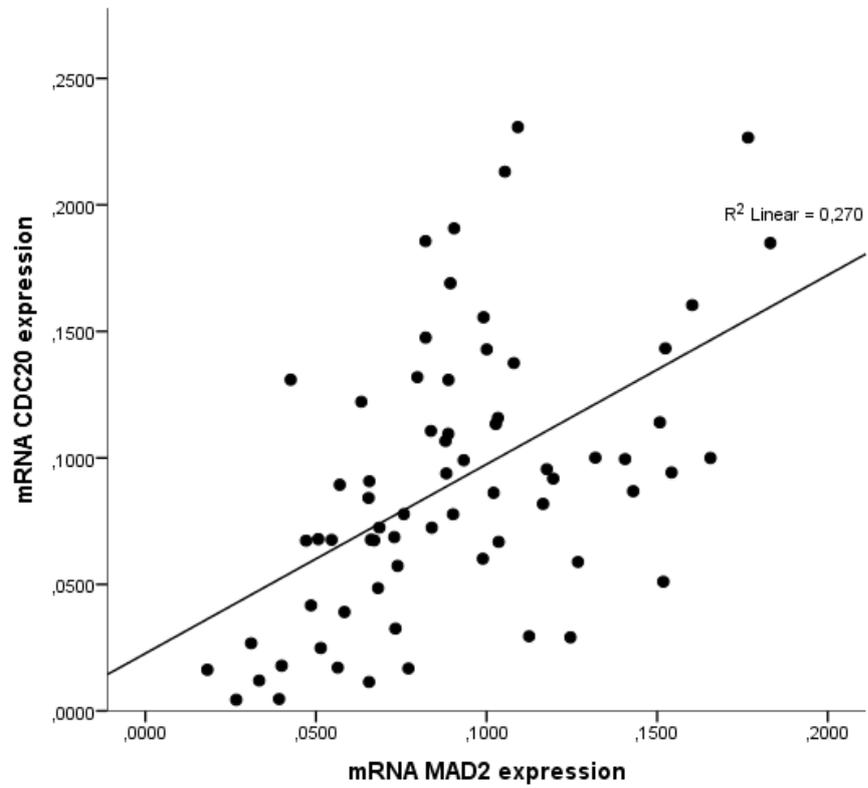
Em seguida, observou-se que há uma correlação muito forte entre os níveis de expressão dos genes *CDC20* e *AURKB* ( $r=0.790$ ;  $p<0.001$ ). Estes dados demonstram que o gene *CDC20* influencia em 62,4% ( $r^2=0.624$ ) no nível de expressão do gene *AURKB* em agricultores expostos à agrotóxicos (Figura 28).

**Figura 28:** Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes *CDC20* e *AURKB*.



Por fim, observou-se que há uma forte correlação entre os genes *CDC20* e *MAD2* ( $r=0.520$ ;  $p<0.001$ ), demonstrando que estes genes são responsáveis por 27,0% ( $r^2=0.270$ ) da variação dos seus respectivos níveis de expressão em agricultores expostos à agrotóxicos (Figura 29).

**Figura 29:** Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes *CDC20* e *MAD2*.



## 5 DISCUSSÃO

O presente estudo buscou avaliar o nível de expressão de 5 genes relacionados aos mecanismos de regulação do ciclo celular (*CDKN1A*), ponto de checagem mitótico (*MAD2* e *CDC20*) e fuso mitótico (*AURKA*, *AURKB*) frente às variáveis sócio-demográficas e clínicas em amostras de medula óssea de agricultores expostos a pesticidas em cultivos localizados na cidade de Limoeiro do Norte, no estado do Ceará. Além disto, foram avaliados os cromossomos e o material genético de um pool de células da medula óssea contendo células tronco hematopoéticas (CTH) obtidas a partir de aspirado da medula óssea que, por acumularem mutações sucessivas ao longo da vida, provavelmente podem explicar os nossos resultados.

Na casuística do presente estudo, quando os agricultores foram analisados quanto ao tipo de exposição, observou-se o predomínio de casos que utilizaram agrotóxicos do tipo organofosforado em relação ao demais produtos citados (Tabela 02). Esse achado corrobora com os dados da metanálise de Jin e cols. 2014, cuja análise específica para cada pesticida mostrou que o aumento de risco para Síndrome Mielodisplásica (SMD) estava associado com a exposição aos organofosforados (OR=1.71, 95% CI 1.22-2.40) mas não com a exposição a fungicidas e herbicidas. Nesta mesma metanálise, que incluiu 11 estudos do tipo caso-controle e avaliou 1.942 casos e 5.359 controles, foi demonstrada uma correlação entre a exposição a pesticidas e um aumento significativo do risco de desenvolvimento de Síndrome Mielodisplásica (SMD) (OR=1.95, 95% CI 1.23-3.09) (JIN, 2014). Este estudo fortalece a associação entre a exposição ocupacional a pesticidas e o desenvolvimento de doenças neoplásicas no tecido hematopoético da medula óssea.

Para avaliarmos a hipótese de que os agrotóxicos possuem ação genotóxica no tecido hematopoético de indivíduos expostos, utilizamos amostras de medula óssea desses indivíduos. Vale destacar que as células-tronco hematopoéticas (CTH) têm a capacidade de

auto-renovação e podem persistir por toda a vida (SHOUJUN, 2017). Esse fenômeno aumenta o risco de acumular mutações deletérias adquiridas durante a sua existência (VITRE, 2012). Além disso, as lesões não reparadas em CTH podem ser passadas e amplificadas nas células-filhas durante o processo de auto-renovação e diferenciação em situações que demandem aumento da proliferação celular (NAKA, 2011).

O material obtido em aspirado da medula óssea é representado por CTH e sua linhagem progenitora. A CTH é também particularmente sensível ao stress oxidativo e o seu elevado índice proliferativo a torna mais vulnerável aos pesticidas (MENA, 2009). Sabe-se que os pesticidas têm propriedades mutagênicas que induzem alterações cromossômicas ou danos no DNA de células da medula óssea expostas a esses produtos (GIRI, 2002).

No presente trabalho, dez indivíduos expostos a pesticidas apresentaram anormalidades cromossômicas nas células da medula óssea. Estas anomalias podem ser divididas em dois subtipos: alterações numéricas e estruturais. Foram observados seis casos de aneuploidias, uma alteração cromossômica do tipo numérica que pode ocorrer devido a um cromossomo extra ou ausente (EASTMOND, 1990).

Gordon e colaboradores (2012) citam que algumas células cancerígenas apresentam número anormal de cromossomos que pode surgir em decorrência de problemas ocorridos durante a divisão celular. Durante o processo de divisão, devido a erros enzimáticos ou a uma elevada instabilidade genômica, os cromossomos não se separam adequadamente entre as duas células e formam células aneuplóides (VITRE, 2012; GORDON, 2012).

Essas alterações cromossômicas estão bastante relacionadas ao prognóstico das doenças malignas (POMBO-DE-OLIVEIRA, 2017). Em pacientes com diagnóstico de mieloma múltiplo, por exemplo, cujas células malignas apresentam hipodiploidia (menos de 46 cromossomos) o prognóstico se torna desfavorável, sendo um achado relativamente

comum (SWERDLOW, 2016). Entre os casos encontrados nesse estudo foram observados trabalhadores rurais com 20 ~ 30, 32, 33 cromossomos, casos típicos de aneuploidia.

Uma observação importante é o fato de que o pesticida glifosato, um dos mais utilizados pelos trabalhadores desse estudo, é capaz de alterar o ciclo celular em modelos experimentais (BELLÉ, 2002). Nesses animais, o glifosato inibe a síntese do DNA que ocorre na fase S do ciclo celular e ainda provoca o retardo da fase M pela ativação da CDK1/Ciclina B (MARC, 2004). Agindo desta forma, o pesticida poderia retardar o tempo de proliferação celular das culturas de células da medula óssea desses trabalhadores. Este retardo impediria o bloqueio do ciclo celular na fase de metáfase induzido pela colchicina, etapa fundamental para a visualização da morfologia dos cromossomos na citogenética. Esta ação do pesticida poderia explicar o elevado número de casos em que não houve o crescimento celular esperado para a visualização de metáfases.

Nesta pesquisa, realizamos o primeiro estudo de análise da expressão dos 5 genes relacionados à regulação do ciclo celular (*CDKN1A*), ponto de checagem mitótico (*MAD2* e *CDC20*) e fuso mitótico (*AURKA*, *AURKB*) em agricultores expostos a pesticidas.

No presente estudo, avaliamos os níveis de expressão do mRNA do gene *CDC20* e encontramos um aumento significativo na expressão desse gene tanto no grupo de agricultores grande produtores como no grupo de cultivo familiar quando comparados a agricultores de cultivo ecológico (Tabela 2). Vários estudos têm evidenciado a forte associação do aumento da expressão do gene *CDC20* com a presença de aneuploidias em neoplasia de mama (KAVA, 2014), bem como a forte relação com evolução de pior prognóstico e diminuição da sobrevida no câncer de mama, no câncer colorretal, no câncer gástrico, no carcinoma hepatocelular e no câncer de pulmão não pequenas células (KATO, 2012; WU, 2013; KAVA, 2014; DING, 2014; LI, 2014).

Em estudos com tecido hematopoético da medula óssea, demonstramos que o aumento da expressão protéica do *CDC20* está associado com a presença de cariótipo complexo em pacientes com SMD (GENGA, 2015). Mais recentemente, confirmamos um aumento da expressão do gene *CDC20* em pacientes com SMD de alto risco (BORGES, 2018). Tais estudos permitem associar o aumento da expressão de *CDC20* a um aumento da instabilidade genômica na célula e evolução de pior prognóstico nos pacientes com SMD.

Neste contexto, hipotetizamos que o aumento da expressão de *CDC20* estaria relacionado a um mecanismo de escape do Complexo Promotor da Anáfase (CPA) para prosseguir com a divisão celular. O fato de também haver aumento significativo da expressão de *CDC20* nos indivíduos que utilizaram organofosforados e paraquat colaboraria para esta hipótese. Diante disso é possível destacar o aumento da expressão de *CDC20* como um possível marcador de biomonitoramento para neoplasias na população de agricultores expostos aos agrotóxicos.

Outro importante achado desta pesquisa foi a observação da diminuição da expressão do gene *CDKN1A* nos indivíduos de grande produção e agricultura familiar quando comparados com agricultores de cultivo ecológico. Além disso, observou-se uma diminuição da expressão de *CDKN1A* nos indivíduos que relataram uso de paraquat quando comparado àqueles que não referiram uso. Sabe-se que algumas vias que levam à senescência da célula têm sido identificadas (LEHNERS, 2018). Neste cenário, a ação de inibidores de ciclina dependentes de quinase (CDK), como o p21Cip1 / Waf1 (*CDKN1A*) pode induzir senescência celular. Por conta disso, o gene *CDKN1A*, que codifica a proteína p21, tem sido estudado como influenciador do processo de tumorigênese, pelo seu potencial de impedir a senescência (BROWN, 1997).

Um estudo para avaliar a senescência analisou amostras tumorais de 125 pacientes em diferentes estágios de mieloma múltiplo através de imunohistoquímica para expressão de

marcadores de senescência. A expressão proteica do inibidor da quinase dependente de ciclina p21Cip1 / Waf1 foi significativamente maior no mieloma múltiplo *smoldering* (SMM) em comparação com a gamopatia monoclonal de significado indeterminado (MGUS) ( $p = 0,02$ ) ou mieloma múltiplo sintomático (MM) ( $p = 0,005$ ). Os plasmócitos SMM expressando p21Cip1 / Waf1 foram negativos para Ki67, consistente com a senescência (LEHNERS, 2018).

Associando esta discussão à expressão de *CDKN1A* em agricultores, vemos que essa diminuição da expressão poderia ser explicada por um ganho de vantagem proliferativa da célula e o escape das vias de indução da senescência de células com material genético extremamente danificado, provavelmente, pela exposição aos agrotóxicos. Estudos futuros são necessários para confirmar esta hipótese.

Outro gene relacionado ao ponto de checagem mitótico é o *MAD2*, que possui mecanismo de ação interligado ao gene *CDC20*. O presente estudo observou um aumento de expressão de *MAD2* nos agricultores com hábito de tabagismo em relação aos que não tinham esse hábito (Tabela 2). Além disto, *MAD2* e *CDC20* foram fortemente correlacionados, atuando com uma influência de 27% de um gene sobre o outro ( $r^2=0.270$ ) (Figura 28).

Outra recente metanálise evidenciou que um aumento da expressão de *MAD2* está associado a um risco aumentado de mortalidade por todas as causas e recorrência de todos os tipos de câncer (BYRNE, 2017). Demonstramos também através de imuno-histoquímica de tecido hematopoético da medula óssea, que o aumento da expressão de *MAD2* está associado à plaquetopenia grave em pacientes com SMD (GENGA, 2015).

Neste sentido, nos agricultores, ou seja, em indivíduos em situação de risco pela exposição ocupacional crônica, visualizamos que esse aumento de expressão consiste em um achado importante no processo de instabilidade genômica, e também, pode estar associado a

uma potencialização do efeito genotóxico naqueles indivíduos que fumam quando comparado aos que não fumam.

Alterações de expressão de proteínas envolvidas na segregação cromossômica (proteínas associadas ao cromossomo) e no fuso mitótico têm sido associadas com o desenvolvimento de aneuploidia em células tumorais (MICHEL et al. 2001; SAKAKURA et al. 2001; MONDAL et al. 2007; SOTILLO et al. 2007; PINTO et al. 2007; LI et al. 2009). O presente trabalho evidenciou um aumento da expressão de *AURKA* nos agricultores com maior tempo de exposição (21 a 30 anos) quando comparado àqueles com menor tempo de exposição (1 a 10 anos). A avaliação da expressão de *AURKB* na população estudada mostrou uma diminuição da expressão desse gene nos agricultores que usaram agrotóxico do tipo herbicida frente aos que não relataram o uso.

A família das aurora quinases está envolvida no complexo centrossomal (*AURKA*) e no complexo de proteínas associadas ao cromossomo (*AURKB*). Durante a proliferação celular normal, centrossomos asseguram a correta segregação dos cromossomos através da organização do fuso mitótico bipolar.

*AURKA* está relacionada à regulação da separação e maturação do centrossomo (LI et al. 2003; TONG et al. 2004; LUKASIEWICZ e LINGLE 2009). *AURKB*, juntamente com survivina e proteínas internas do centrômero (complexo de proteínas associadas ao cromossomo) desempenha papel crucial no alinhamento e biorientação dos cromossomos, ativação do ponto de checagem mitótico; e na citocinese (DUCAT e ZHENG 2004; VAGNARELLI e EARNSHAW 2004; BOLANOS-GARCIA 2005).

Diversos são os trabalhos que relatam alterações na expressão gênica e protéica em *AURKA* e *AURKB* associadas à instabilidade cromossômica, agressividade dos tumores e pior prognóstico dos pacientes (LASSMANN et al. 2009; IKEZOE et al. 2009; LIN et al. 2010; LOH et al. 2010; LUCENA-ARAUJO et al. 2011). Demonstramos amplificação de *AURKA*

em SMD, reforçando a idéia de que o processo de maturação e separação dos centrossomos são fenômenos associados ao processo de carcinogênese (HEREDIA, 2012).

A hiperexpressão de *AURKA* poderia explicar o elevado número de clones aneuplóides encontrado nesta população estudada. Tal fato pode ainda representar uma etapa de evolução clonal para o surgimento de neoplasias no tecido hematopoético, quando o aumento da instabilidade genômica após sucessivas divisões celulares levaria à formação de clones tumorais aneuplóides (VITRE, 2012; DUESBERG, 2003). Já a hipoeexpressão de *AURKB* pode estar relacionada ao potencial dos herbicidas como o glifosato para inibir a síntese do DNA que ocorre na fase S do ciclo celular e ainda provocar o retardo da fase M (MARC, 2004).

Uma importante limitação deste estudo está associada à necessidade de validação funcional do perfil e do impacto da expressão dos genes avaliados em uma casuística mais ampla de casos, seja, por exemplo, por análises proteômicas, análises de modelos murinos *knockout* para os referidos genes ou sequenciamento de última geração quanto à avaliação de novas alterações polimórficas passíveis de impactarem o correto funcionamento desses genes em agricultores expostos à agrotóxicos. No entanto, sabemos que a obtenção de 95 amostras de medula óssea para um grupo de risco, não de pacientes, e que não apresentava qualquer sinal de doença hematológica ou na medula óssea, não é tarefa fácil e nos reforça a dificuldade de estudos dessa natureza. Nesse momento, nosso grupo segue realizando análises destes genes com sequenciamento de última geração e análise de metilação.

Em síntese, demonstramos que os genes relacionados ao ponto de checagem mitótico e controle do ciclo celular podem estar relacionados a um quadro de instabilidade genômica e cromossômica nos agricultores, fato já evidenciado na patogênese de diversas neoplasias. Assim, acreditamos que estes genes podem ser candidatos a novos biomarcadores de

exposição genotóxica, favorecendo o desenvolvimento de novas ações de vigilância epidemiológica para o trabalhador do campo.

## 6 CONCLUSÕES

A partir do desenvolvimento deste estudo, podemos concluir que:

- A exposição crônica aos agrotóxicos leva à ocorrência de alterações cromossômicas em células da medula óssea. As anormalidades encontradas são semelhantes às alterações descritas de forma recorrente em doenças clonais da medula óssea como síndromes mielodispásicas e leucemias mielóides agudas;
- Identificamos que o aumento da expressão de *CDC20* pode estar relacionado a um mecanismo de escape do Complexo Promotor da Anáfase (CPA) para prosseguir com a divisão celular;
- Visualizamos que a diminuição da expressão de *CDKN1A* em agricultores pode ser explicada por um mecanismo da célula de permitir a senescência de células com material genético extremamente danificado;
- Hipotetizamos, assim, que os genes *CDC20* e *CDKN1A* podem corresponder a novos marcadores moleculares para a exposição ocupacional crônica a agrotóxicos;
- Demonstramos que os genes relacionados ao controle do ciclo celular possuem expressão descontrolada em indivíduos expostos a agrotóxicos. Estes resultados suportam a importância dos genes *AURKA*, *AURKB*, *MAD2*, *CDC20* e *CDKN1A* na manutenção da estabilidade genômica das células tronco hematopoiéticas e podem estar envolvidos no processo de carcinogênese.

## 7 REFERÊNCIAS

Adès L, Itzykson R, Fenaux P. Myelodysplastic syndromes. *The Lancet*. 2014; 383(9936): 2239 - 2252.

Agopian J et al. Agricultural pesticide exposure and the molecular connection to lymphomagenesis. *The Journal of Experimental Medicine* 2017.

Afonso O, Figueiredo AC, Maiato H. Late mitotic functions of Aurora kinases. *Chromosoma*. 2016; 1-11.

Augusto, L G S.; Carneiro, F F; Pignati, W; Rigotto, R M; Friedrich, K; Faria, N M X. Búrigo, A.C.; Freitas, V.M.T.; Guiducci Filho, E. Dossiê ABRASCO – Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. ABRASCO, Rio de Janeiro, junho de 2012. 2ª Parte. 135p.

Adès L, Itzykson R, Fenaux P. Myelodysplastic syndromes. *The Lancet*. 2014; 383(9936): 2239 - 2252.

A Petitjean, MIW; Achatz, AL Borresen-Dale, P Hainaut, M Olivier. TP53 mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes. *Oncogene* 2007 26, 2157–2165.

Aparicio S and Caldas C. The implications of clonal genome evolution for cancer medicine. *The New England Journal of Medicine*. 2013; 368: 842-51.

Battershill JM, Boobis AR, Fletcher K, Bull S. Evidence for genotoxicity of pesticides in pesticide applicators: a review. *Mutagenesis* 2006; 21(2): 93-106.

Barret C. Mechanisms of multistep carcinogenesis and carcinogen risk assessment. *Environmental Health Perspectives* 1993; 100: 9-20.

Bejar R, et al. Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med*, 2011; 364(26):2496-506.

Braunstein I, et al. Inhibitory factors associated with anaphase-promoting complex/cylosome in mitotic checkpoint. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; 104(12): 4870-4875.

Bellé R, Marc J. Pesticide Roundup provokes cell division dysfunction at the level of CDK1/cyclin B activation. *Chem. Res. Toxicol*. 2002; 15:326-331.

Bhalli JA, Khan QM, Haq MA, Khalid AM and Nasim A. 2006. Cytogenetic analysis of Pakistani individuals occupationally exposed to pesticides in a pesticide production industry. *Mutagenesis* 21(2):143–148.

Biechonski. S. Attenuated DNA damage responses and increased apoptosis characterize human hematopoietic stem cells exposed to irradiation. *Nature* (2018) 8:6071

Blair A, Chiu BCH: Pesticides, Chromosomal Aberrations, and Non-Hodgkin's Lymphoma. *J Agromedicine* 2009; 14(2): 250-255.

Bolognesi C. Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. *Mutation Research* 2003; 543: 251–272

Borges DP. Prognostic importance of Aurora Kinases and mitotic spindle genes transcript levels in Myelodysplastic syndrome. *Leuk Res.* 2018 Jan;64:61-70

Braunstein I, et al. Inhibitory factors associated with anaphase-promoting complex/cylosome in mitotic checkpoint. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007; 104(12): 4870-4875.

Brusick D<sup>1</sup>, Aardema M<sup>2</sup>, Kier L<sup>3</sup>, Kirkland D<sup>4</sup>, Williams G<sup>5</sup>. Genotoxicity Expert Panel review: weight of evidence evaluation of the genotoxicity of glyphosate, glyphosate-based formulations, and aminomethylphosphonic acid. *Crit Rev Toxicol.* 2016 Sep;46(sup1):56-74

Bueno et al. Plano Integrado de Ações de Vigilância em Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos. Ministério da Saúde (MS), 2009.

Cabello G, Valenzuela M, Vilaxa A, Durán V, Rudolph I, Hrepic N, Calaf G. A rat mammary tumor model induced by the organophosphorous pesticides parathion and malathion, possibly through acetylcholinesterase inhibition. *Environmental Health Perspectives* 2001; 109 (5): 471-479.

Cahill DP, Lengauer C, Yu J, Riggins GJ, Willson JK, Markowitz SD, Kinzler KW, Vogelstein B. Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers. *Nature.* 1998; 392:300–303

Calaf GM, Echiburu-Chau C, Roy D. Organophosphorous pesticides and estrogen induce transformation of breast cells affecting *p53* and *c-Ha-ras* genes. *International Journal of Oncology* 2009; 35: 1061-68.

Carneiro, F F; Pignati, W; Rigotto, R M; Augusto, L G S. Rizzolo, A; Faria, NMX; Alexandre, V P.; Friedrich, K; Mello, M S C. Dossiê ABRASCO – Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Parte 1 - Agrotóxicos, Segurança Alimentar e Nutricional e Saúde. Rio de Janeiro: ABRASCO, 2012.

Cazzalini A, et al. Multiple roles of the cell cycle inhibitor p21CDKN1A in the DNA damage response. *Mutation Research.* 2010; 704:12-20.

Cazzola M, Porta MGD, Malcovati L. The genetic basis of myelodysplasia and its clinical relevance. *Blood.* 2013; 122(25): 4021-4034.

Chamseddine AN, et al. Unraveling Myelodysplastic Syndromes: Current Knowledge and Future Directions. *Curr Oncol Rep*. 2016; 18(4): 1-11.

Chang DZ, Ma Y, Ji B, Liu Y, Hwu P, Abbruzzese JL, Logsdon C, Wang H. (2012) Increased CDC20 expression is associated with pancreatic ductal adenocarcinoma differentiation and progression. *J Hematol Oncol*. 2012; 5: 15.

Chen J, Liu J. Spindle Size Scaling Contributes to Robust Silencing of Mitotic Spindle Assembly Checkpoint. *Biophysical Journal*. 2016; 111:1064-1077.

Chen J, Liu J. Spindle Size Scaling Contributes to Robust Silencing of Mitotic Spindle Assembly Checkpoint. *Biophysical Journal*. 2016; 111:1064-1077.

Coleman WB, Tsongalis GJ. Molecular mechanisms of human carcinogenesis. *Cancer: Cell Structures, carcinogens and Genomic instability*. 2006.

Collins AR. The Comet Assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Molecular Biotechnology* 2004; 26: 249-261.

Cosenza MR. Centrosome amplification, chromosomal instability and cancer: mechanistic, clinical and therapeutic issues. *Chromosome Res* (2016) 24:105–126

Duesberg P, Li R. Multistep carcinogenesis: a chain reaction of aneuploidizations. *Cell cycle* 2003; 2: 202-210.

Diaz-Rodriguez E, et al. Deficient spindle assembly checkpoint in multiple myeloma. *Plos one*. 2011; 6(11):e27583.

Eastmond D, Pinkel D. 1990. Detection of aneuploidy and aneuploidy-inducing agents in human lymphocytes using fluorescence in situ hybridization with chromosome-specific DNA probes. *Mutation Research* 234: 303-318.

Eastmond DA, Schuler M, Rupa DS. 1995. Advantages and limitations of using fluorescence in situ hybridization for the detection of aneuploidy in interphase human cells. *Mutat Res* 348:153–162.

Ellery AEL; Arregi MMU; Rigotto MR. Câncer em trabalhadores rurais:face da iniquidade com a saúde da população camponesa. 2010.

Egan JM..Targeting Stem Cells in Chronic Myeloid Leukemia with a PPAR- $\gamma$  Agonist. *N Engl J Med*. 2015 Nov 12;373(20):1973-5

Faesen AC, et al. Basis of catalytic assembly of the mitotic checkpoint complex. *Nature*. 2017.

Filipic M, Hreljac I, Zajc I, Lah T: Effects of Model Organophosphorous Pesticides on DNA Damage and Proliferation of HepG2 Cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 2008; 49:360-367.

Frohling S, Dohner H. 2008. Chromosomal abnormalities in cancer. *The New England Journal of Medicine* 359: 722-34.

Gauduchon P, Pottier D, Briand M, Lecluse Y, Lebailly P, Roulland S. Characterization of the t(14;18) BCL2-IGH translocation in farmers occupationally exposed to pesticides. *Cancer Research* 2004; 64: 2264-2269.

Genga KR, et al. Proteins of the mitotic checkpoint and spindle are related to chromosomal instability and unfavourable prognosis in patients with myelodysplastic syndrome. *J Clin Pathol.* 2015; 0:1-7.

Goldenson B, Crispino JD. The Aurora Kinases in Cell Cycle and Leukemia. *Oncogene.* 2015; 34(5): 537-545.

Gordon DJ, Resio B and Pellman D. 2012. Causes and consequences of aneuploidy in cancer. *Nature reviews genetics* 13: 189-203.

Goodson WH III, Lowe L, Carpenter DO, Gilbertson M, Manaf Ali A, Lopez de Cerain Salsamendi A, et al. 2015. Assessing the carcinogenic potential of low-dose exposures to chemical mixtures in the environment: the challenge ahead. *Carcinogenesis* 36(suppl 1):S254–S296.

Gregorio LP and Colus IM. 2000 Cytogenetic and molecular biomonitoring of agricultural workers exposed to pesticides in Brazil. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* 20: 161–171.

Greim H. Evaluation of carcinogenic potential of the herbicide glyphosate, drawing on tumor incidence data from fourteen chronic/carcinogenicity rodent studies. *Crit Rev Toxicol*, 2015; 45(3): 185–208

Guyton KZ, Loomis D, Grosse Y, El Ghissassi F, Benbrahim-Tallaa L, Guha N, et al. 2015. Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate. *Lancet Oncol* 16:490–491.

Guyton KZ et al. 2018. Application of the key characteristics of carcinogens in cancer hazard identification. *Carcinogenesis*, 2018, Vol. 39, No. 4, 614–622

Han J, Cao S, Zhang K, Zhao G, Xin Y, Dong Q, Yan Y, Cui J. 2012. Fluorescence in situ hybridization as adjunct to cytology improves the diagnosis and directs estimation of prognosis of malignant pleural effusions. *Journal of Cardiothoracic Surgery* 7:121.

Hananah D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011; 144:646-74.

Heinrich S, et al. Determinants of robustness in spindle assembly checkpoint signaling. *Nature Cell Biology*. 2013; 15(11): 1328-1339.

Heredia FF, et al. Aurora-B expression may not contribute to disease progression: a reflection of the heterogeneous pathogenesis? *Haematologica*. 2012; 97:e37-e39.

Heredia FF, et al. Proteins related to the spindle and checkpoint mitotic emphasize the different pathogenesis of hypoplastic MDS. *Leukemia Research*. 2014; 38:218-224.

Hoeijmakers JHJ. DNA damage, aging, and cancer. *N England J Medicine* 2009; 361: 1475-85.

Holland NT, Duramad P, Rothman N, Figgs LW, Blair A, Hubbard A and Smith MT 2002. Micronucleus frequency and proliferation in human lymphocytes after exposure to herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in vitro and in vivo. *Mutation. Research*. 521: 165–178.

Hoyos LS, Cravajal S, Solano L, Rodriguez J, Orzoco L, Lopez Y. and Au WW. 1996. Cytogenetic monitoring of farmers exposed to pesticides in Colombia. *Environmental Health Perspectives* 104: 535–538.

Hu, L. The association between non-Hodgkin lymphoma and organophosphate pesticides exposure: A meta-analysis. *Environmental Pollution* 231 (2017) 319e328

IARC. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to humans, International Agency for Research on Cancer, Lyon: IARC;2015. Acesso em 14 maio 2017. Disponível em: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/PDFs/index.php>.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo Agropecuário 2006. [Acesso em 12 dez. 2017] Disponível em: [http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/2006/tabela1\\_3\\_1\\_0.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/2006/tabela1_3_1_0.pdf)>.

Jain AK, Barton MC. p53: emerging roles in stem cells, development and beyond. *Development*. 2018 Apr 13;145(8)

Jenkins RB, Le Beau MM, Kraker WJ, et al. 1992. Fluorescence *in situ* hybridization: a sensitive method for trisomy 8 detection in bone marrow specimens. *Blood* 79:3307-15.

Jin, J et al. Pesticide Exposure as a risk factor for myelodysplastic syndromes: a meta-analysis based on 1.942 cases and 5359 controls. *PLOS ONE* 2014 october 2014 vol 9 issue 10 e110850.

Kaneko H, Misawa S, Horiike S, Nakai H, Kashima K. 1995. TP53 mutations emerge at early phase of myelodysplastic syndrome and are associated with complex chromosomal abnormalities. *Blood* 85(8):2189-93.

- Kitzen JJEM, Jonge MJA, Verweij J. Aurora Kinase inhibitors. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2010; 73: 99-110. 100
- Livak, KJ., Schmittgen, TD. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the 2(-Delta DeltaC(T) ) method. *Methods*. 2001; 25:402-408.
- Karimian A, Ahmadi Y, Yousefi B. Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage. *DNA Repair*. 2016; 42:63-71.
- Kawankar N, Vundinti BR. Cytogenetic abnormalities in myelodysplastic syndrome: an overview. *Haematology*. 2011; 16(3): 131-138.
- Keller-Byrne JE, Khuder SA. Meta-Analyses of leukemia and farming. *Environment Res*. 1995;71; 1-10.
- Keller-Byrne JE, Khuder SA. Meta-Analyses of prostate cancer and farming. *American Journal of Industrial Medicine*. 1997;31; 580-586.
- Khan QM, Ali T, Bhalli JA, Rana SM. Cytogenetic damage in female Pakistani agricultural workers exposed to pesticides. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 2008; 49:374-380.
- Khuder AS ET al. Meta-analyses of multiple myeloma and farming. *Am J Int Med*. 1997;32(5): 510-6.
- Khuder AS ET al. Meta-analyses of non-hodgkin's lymphoma and farming. *Scandinavian Journal of Work, Environment and Health*. 1998;24(4): 225-261.
- Kitzen JJEM, Jonge MJA, Verweij J. Aurora Kinase inhibitors. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2010; 73: 99-110. 100
- Krishnamurti U, Hammers JL, Atem FD, Storto PD, Silverman JF. 2009. Poor prognostic significance of unamplified chromosome 17 polysomy in invasive breast carcinoma. *Mod Pathol*, 22:1044–1048.
- Kvitko K, Rohr P, Zucchetti G, Silla LMR. Aspectos ambientais e genéticos no desenvolvimento de leucemias. *Rev Brasileira de Biociências* 2008; 6(4): 369-373.
- Lima DS, Cordeiro J, Magalhaes SM, Pinheiro RF. Interphase-FISH provides additional relevant information in myelodysplastic syndromes. *Leuk Res*. 2012;36(1):12-4
- London N, Biggins S. Signalling dynamics in the spindle checkpoint response. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2014.
- Lucena-Araújo AR, et al. High expression of AURKA and AURKB is associated with unfavorable cytogenetic abnormalities and high white blood cell count in patients with acute myeloid leucemia. *Leukemia Research*. 2011; 35:260-264.

Londres Flavia. Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida. – Rio de Janeiro: AS-PTA – Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa, 2011.

López-Lázaro The stem cell Division theory of câncer. *Critical Reviews in Oncology / Hematology* 123 (2018) 95–113

Lubs, HÁ, Samuelson, L. Chromosome abnormalities in lymphocytes from normal human subjects. *Cytogenetics*. 1967; 6: 402-411.

Lucero L, Pastor S, Suarez S, Durban R, Gomez C, Parron T. and Marcos R. 2000. Cytogenetic biomonitoring of Spanish green house workers exposed to pesticides: micronuclei analysis in peripheral blood lymphocytes and buccal epithelial cells. *Mutation Research* 464: 255–262.

Machado JMH, Peres F, Hennington E, Beltrami AC. Reflexões e contribuições para o Plano Integrado de Ações de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde (MS) de populações expostas a agrotóxicos. *Rev Ciência e Saúde Coletiva* 2007; 12(1): 300-324.

Marc J, Bellé R. Formulated glyphosate activates the DNA-response checkpoint of the cell cycle leading to the prevention of G2/M transition. *Toxicological sciences*. 2004; 82:436-442.

Massoner A, Augustin F, Duba HC, Zojer N, Fiegl M. 2004. FISH cytogenetics and prognosis in breast and non-small cell lung cancers. *Cytometry B Clin Cytom* 62:52–56.

Mylkikangas S, Himberg J, Bohling T, Nagy B, Hollmen J, Knuutila S. 2006. DNA copy number amplification profiling of human neoplasms. *Oncogene* 25: 7324–7332.

Mena S, Ortega A, Estrela JM. 2009. Oxidative stress in environmental-induced carcinogenesis. *Mutation Research* 674: 36-44.

Naeim F, Rao PN, Grody WW. Myelodysplastic Syndromes. In *Hematopathology – Morphology, Immunophenotype, Cytogenetics and Molecular Approaches*, 1st Edition. USA: Academic Press Publication, 2008; 129-154.

Naka K, Hirao A. Maintenance of genomic integrity in hematopoietic stem cells. *International Journal of Hematology* 2011.

Nisse, C et al. Occupational and environmental risk factors of the myelodysplastic syndromes in the North of France. *British Journal of Hematology*. 2001; 112: 927-935.

Norppa H, Tuimala J, Szekely G, Wikman H, Järventaus H, Hirvonen A, Gundy S. Genetic polymorphisms of DNA repair and xenobiotic-metabolizing enzymes: effects on levels of sister chromatid exchanges and chromosomal aberrations. *Mutation Research* 2004; 554:319-333.

Oliveira PA, Colaço A, Chaves, R, Guedes-Pinto H, Lopes C. Chemical Carcinogenesis. *Na Acad Bras Cienc* 2007; 79(4): 593-616.

Olivier, M; Hollstein, M.; Hainaut, P. TP53 Mutations in Human Cancers: Origins, Consequences, and Clinical Use. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010;2:a001008.

Otto T, Sicinski P. Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2017; 17(2): 93-115.

Pastor S, Creus A, Xamena N, Siffel C and Marcos R 2002. Occupational exposure to pesticides and cytogenetic damage: results of a Hungarian population study using micronucleus assay in lymphocytes and buccal cells. *Environmental Molecular Mutagenesis*.40: 101–109.

Prasad S, Srivastava S, Singh M, and Shukla Y. 2009. Clastogenic Effects of Glyphosate in Bone Marrow Cells of Swiss Albino Mice. *Journal of Toxicology* 1-6.

Pacheco, Adil de Oliveira; Hackel, Christine. Chromosome instability induced by agrochemicals among farm workers in Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brazil. *Cad. Saúde Pública*, v. 18, n. 6, p. 1675-1683, nov./dez. 2002.

Paiva JCG, Cabral IO, Soares BM, Sombra CML, Ferreira JRO, Moraes MO, Cavalcanti BC, 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 cytogenetics studies. *Environmental and molecular mutagenesis* 52 (6): 492-501.

Pannunzio NR. 2018. Concept of DNA Lesion Longevity and Chromosomal Translocations. *Trends in Biochemical Sciences*, 2018, Vol. xx, No. yy

Paz-y-Mino C et al. Bustamante G, Sanchez ME, Leone PE. 2002. Cytogenetic monitoring in a population occupationally exposed to pesticides in Ecuador. *Environmental Health Perspectives* 110(11): 1077- 1080.

Pignati WA, Machado JMH, Cabral JF. Acidente Rural ampliado: o caso das “chuvas” de agrotóxicos sobre a cidade de Lucas do Rio Verde – MT. *Ciência e Saúde Coletiva* 2007; 12(1): 105-114.

Pinheiro RF, Serio FM, Silva MR, Briones MR, Chauffaille ML. Association of loss of heterozygosity with cytogenetic abnormalities in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *Braz J Med Biol Res*. 2008;41(7):610-4.

Pinheiro RF, Chauffaille ML. Comparison of I-FISH and G-banding for the detection of chromosomal abnormalities during the evolution of myelodysplastic syndrome. *Braz J Med Biol Res*. 2009; 42(11):1110-2.

Portella G, Passaro C, Chieffi P. Aurora B: A New Prognostic Marker and Therapeutic Target in Cancer. *Current Medicinal Chemistry*. 2011; 18: 482-496.

Ramos, MESP. Biomonitoramento genético de indivíduos expostos ocupacionalmente a pesticidas no povoado Vila Bessa, município de Conceição do Jacuípe, Bahia. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia – UFC. Fortaleza, 2009.

Ravegnini G. Key Genetic and Epigenetic Mechanisms in Chemical Carcinogenesis. *Toxicol Sci.* 2015 Nov;148(1):2-13.

Reed L. 2018. The Role of Cytochrome P450 Enzymes in Carcinogen Activation and Detoxication: An in vivo-in vitro Paradox. *Carcinogenesis.* 2018 May 3

Rigotto RM et al. Agrotóxicos, Trabalho e Saúde: Vulnerabilidade e Resistência no Contexto da Modernização Agrícola no Baixo Jaguaribe – CE. Co-edição com a Expressão Popular. – Fortaleza: Edições UFC, 2011.

Rigotto RM et al. Estudo epidemiológico da população da região do baixo Jaguaribe exposta à contaminação ambiental em área de uso de agrotóxicos. Pesquisa apoiada pelo CNPq e Ministério da Saúde por meio do Edital MCT-CNPq/MS-SCTIEDECIT/CT- Saúde – Nº 24/2006. Fortaleza, 2010.

Roulland S, Agopian J, Navarro JM, Gac AC, Lecluse Y, Briand M, Grenot P, Gauduchon P, Ruminy P, Lebailly P, Nadel B. Agricultural pesticide exposure and the molecular connection to lymphomagenesis. *Journal of Experimental Medicine* 2009; 206 (7): 1473-1483.

Rouquayrol, MZ; Almeida Filho, N. *Epidemiologia e Saúde.* 6. ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2003. 728 p.

Roy D, Calaf GM. Gene expression signature of parathion-transformed human breast epithelial cells. *International Journal of Molecular Medicine* 2007;19: 741-750.

Sailaja, N. et al. Genotoxic evaluation of workers employed in pesticide production. *Mutation Research.* 2006; 609: 74-80.

Scarpa M et al. Inflammatory colonic carcinogenesis: A review on pathogenesis and immunosurveillance mechanisms in ulcerative colitis. *World J Gastroenterol* 2014 June 14; 20(22): 6774-6785

Schuyler SC, Wu Yueh-Fu, Kuan V Jen-Wei. The Mad1–Mad2 balancing act – a damaged spindle checkpoint in chromosome instability and cancer. *Journal of Cell Science.* 2012; 125: 4197-4206. 104

Schwartzman Juan-Manuel, Sotillo R, Benezra R. Mitotic chromosomal instability and cancer: mouse modelling of the human disease. *Nat Rev Cancer.* 2010; 10(2): 102-105.

Sotillo R, Hernando E, Díaz-Rodríguez E, et al. Mad2 overexpression promotes aneuploidy and tumorigenesis in mice. *Cancer Cell.* 2007; 11(1): 9-23.

Schinasi L. Non-Hodgkin Lymphoma and Occupational Exposure to Agricultural Pesticide Chemical Groups and Active Ingredients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2014, *11*, 4449-4527

Schuz J, Meinert R, Kaletsch U, Kaatsch P, Michaelis J. Leukemia and Non-Hodgkin's Lymphoma in childhood and exposure to pesticides: results of a register case-control study in Germany. *American Journal of Epidemiology* 2000; *151*(7): 639-646.

Schuyler SC, Wu Yueh-Fu, Kuan V Jen-Wei. The Mad1–Mad2 balancing act – a damaged spindle checkpoint in chromosome instability and cancer. *Journal of Cell Science*. 2012; *125*: 4197-4206. 104

Silva, Jefferson José Oliveira et al. Influence of social-economic factors on the pesticide poisoning, Brazil. *Rev. Saúde Pública*, v.35, n. 2, p. 130-135, abr. 2001

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 1988; *175*:184-191.

Smith ML, Fornace AJ Jr: Genomic instability and the role of p53 mutations in cancer cells. *Curr Opin Oncology* 1995; *7*: 69-75.

Smith MT et al. Key Characteristics of Carcinogens as a Basis for Organizing Data on Mechanisms of Carcinogenesis. *Environmental Health Perspectives* • volume 124 | number 6 | June 2016

Smith, AM. 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and risk of non-Hodgkin lymphoma: a meta-analysis accounting for exposure levels. *Annals of Epidemiology* 27 (2017) 281-289

Sotillo R, Hernando E, Díaz-Rodríguez E, et al. Mad2 overexpression promotes aneuploidy and tumorigenesis in mice. *Cancer Cell*. 2007; *11*(1): 9-23.

Staudt LM. A closer look at follicular lymphoma. *N Engl J Med*. 2007 Feb 15; *356*(7):741-2.

[Swerdlow](#) SH. 2016. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. [International Agency for Research on Cancer](#), [World Health Organization](#).

Tarazona JV et al. Glyphosate toxicity and carcinogenicity: a review of the scientific basis of the European Union assessment and its differences with IARC. *Arch Toxicol* (2017) *91*:2723–2743

Trakala M, et al. Aurora B prevents delayed DNA replication and premature mitotic exit by repressing p21Cip1. *Cell Cycle*. 2013; *12*(7):1030-41.

Valverde M, Rojas E. Environmental and occupational biomonitoring using the Comet assay. *Mutation Research* 2009; *681*: 93–109.

Veiga MM, Duarte FJC, Meirelles LA. A contaminação por agrotóxicos e os Equipamentos

de Proteção Individual (EPIs). *Rev. Bras. Saúde Ocup.*, São Paulo. 2007;32 (116): 57-68.

Vitre BD. Centrosomes, chromosome instability (CIN) and aneuploidy. *Curr Opin Cell Biol.* 2012 December ; 24(6): 809–815.

Fearon, EF. A Genetic Model for Colorectal Tumorigenesis. *Cell*, Vol. 61, 759-767, June 1, 1990, Copyright © 1990 by Cell Press

Wang L, et al. Targeting Cdc20 as a novel cancer therapeutic strategy. *Pharmacol Ther.* 2015; 151:141-151.

Wang Z, et al. Cdc20: a potential novel therapeutic target for cancer treatment. *Current Pharmaceutical Design*, 2013; 19:3210-4.

Zhou T, et al. Potential Relationship between Inadequate Response to DNA Damage and Development of Myelodysplastic Syndrome. *Int J Mol Sci.* 2015; 16:966-989

West RR, Stafford DA, White AD, Bowen DT, Padua RA. Cytogenetic abnormalities in the myelodysplastic syndromes and occupational or environmental exposure. *Blood* 2000; 95(6): 2093-2097.

Zeljezic D, Garaj-Vrhovac V. Chromosomal aberration and single cell gel electrophoresis (Comet) assay in the longitudinal risk assessment of occupational exposure to pesticides. *Mutagenesis* 2001; 16 (4): 359-363.

Zhou T, et al. Potential Relationship between Inadequate Response to DNA Damage and Development of Myelodysplastic Syndrome. *Int J Mol Sci.* 2015; 16:966-989.

# APÊNDICES

**APÊNDICE A**  
**Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**



Universidade Federal do Ceará/UFC

**Introdução:** Estamos desenvolvendo uma pesquisa intitulada **Expressão de genes relacionados ao ponto de checagem mitótica e fuso mitótico em células da medula óssea de trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos no estado do Ceará, realizada pela Universidade Federal do Ceará (UFC)**, para a qual estamos coletando exames laboratoriais de pessoas que trabalham na plantação de banana, com o intuito de identificar os agravos à saúde daqueles que se encontram expostos.

**Termo de consentimento livre e esclarecido:** Estamos convidando você a participar de uma pesquisa sobre agravos à saúde relacionados à exposição a agrotóxicos em trabalhadores do cultivo da banana na Chapada do Apodi. Para isso, estamos pedindo a sua autorização para participar desta pesquisa. Neste estudo, colheremos informações sobre o seu trabalho e a sua saúde através de questionário, exame médico e análises clínicas, toxicológicas e avaliação da medula óssea, ou seja, o órgão que produz o sangue. Sua participação é importante para que se possa conhecer o perfil de saúde-adoecimento destes trabalhadores, o que pode ajudar a empresa, os órgãos públicos e os próprios trabalhadores a prevenirem eventuais problemas de saúde. Esclarecemos que a sua participação neste estudo é de caráter voluntário – você não é obrigado a participar. Você pode recusar-se a participar ou retirar seu consentimento a qualquer momento, sem penalidade alguma. Não haverá nenhum tipo de remuneração por sua participação. As informações obtidas na pesquisa são **confidenciais** e não será identificada a sua pessoa. A divulgação da pesquisa será feita em eventos e publicações científicas da área da saúde, trabalho e meio ambiente, sem mencionar os nomes dos participantes. Os procedimentos adotados nessa pesquisa não oferecem risco à sua saúde, podendo gerar desconforto durante a coleta de aproximadamente 10 ml de sangue da medula óssea e dos vasos sanguíneos. Você terá acesso aos resultados dos exames e, caso seja encontrada alguma alteração, será oferecido acompanhamento e tratamento no Hospital das Clínicas da Universidade Federal do Ceará.

Eu, \_\_\_\_\_, declaro que, após ter sido esclarecido (a) pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, aceito participar voluntariamente deste protocolo de pesquisa e permito que minhas informações sejam analisadas e utilizadas pelo estudo.

Telefone de contato:

Pesquisador responsável: Luiz Ivando Pires Filho: 85 -9933-5519

---

Sujeito da Pesquisa

**APÊNDICE B**  
**Questionário de Exposição aos Agrotóxicos**

Você trabalha no cultivo da banana?

1. ( ) Sim 2. ( ) Não. Se sim há quanto tempo \_\_\_\_\_ (anos/ meses)

Empresa: ( ) Delmont ( ) Banesa ( ) Pequeno Produtor

NOME: \_\_\_\_\_

DATA DE NASCIMENTO: \_\_\_\_\_ TELEFONE: \_\_\_\_\_

ENDEREÇO \_\_\_\_\_

Foi colhido medula e sangue periférico: 1. ( ) Sim 2. ( ) Não

**PARTE 1 – CARACTERÍSTICA DEMOGRÁFICA**

Nº.	QUESTÃO	CATEGORIAS	PULE PARA
110	Qual a cidade em que você mora atualmente?  OBS. Se for há menos de dez anos, fazer a pergunta 111, se for há mais pular para 112.	<p style="text-align: center;"><b>Quantos anos</b></p> Limoeiro do Norte Quixeré Russas Outra ( _____ ) Não respondeu	 — 1 2 3 4 99

**PARTE 2 - HÁBITOS DE VIDA**

202	Você faz uso de algum tipo de bebida alcoólica?	 Não bebo Raramente bebo Mensalmente Semanalmente Diariamente Não sei Não respondeu	 1 2 3 4 5 88 99 →204
203	Qual o seu tipo de bebida preferida?	Cachaça Cerveja Vinho Conhaque Rum Vodka Outro ( _____ ) Não respondeu	 1 2 3 4 5 6 7 99
204	Você tem o hábito de fumar?	 Não fumo Raramente fumo Diariamente Não respondeu	 1 2 3 99 →207
205	Qual a frequência do uso de fumo por você?	De 1 a 4 vezes ao dia De 5 a 9 vezes ao dia 10 a 19 vezes ao dia Mais de 20 vezes ao dia Não respondeu	 1 2 3 4 99 T anos _____

**PARTE 3 - HISTÓRIA PREGRESSA FAMILIAR**

312	Alguma pessoa da sua família teve algum tipo de câncer nos últimos dez anos?	 Sim Não Quem ( _____ ) Não sei Não respondeu	 1 2 3 88 99 →401
313	Que tipo de câncer essa pessoa da sua família apresentou?	Pele Mama Útero Ovário	 1 2 3 4

		Sangue/Leucemia	5	
		Outros	6	
		(_____)	88	
		Não sei	99	
		Não respondeu		

**PARTE 4 - CARACTERIZAÇÃO DO TRABALHO**

401	Quantos anos de trabalho na agricultura você tem?	Menos de 01 ano	1	
		De 01 a 04 anos	2	
		De 05 a 08 anos	3	
		De 08 a 12 anos	4	
		Mais de 12 anos	5	→403
		Não sei	88	
		Não respondeu	99	
402	Qual a sua atividade de trabalho, antes de trabalhar na agricultura?	Estudante	1	
		Autônomo	2	
		Pedreiro	3	
		Eletricista	4	
		Comerciário	5	
		Agricultor	6	
		Outros	7	
		(_____)	99	
		Não respondeu		
405	Em qual setor da empresa você trabalha?	Administração	1	
		Setor de Química/preparação	2	
		Aplicação de químicos	3	
		Plantio	4	
		Preparação de mudas	5	
		Setor de colheitas	6	
		Setor de embalagem	7	
		Restaurante	8	
		Outro (_____)	9	
		Não respondeu	99	
406	Qual a função que você exerce em seu trabalho?	Administrador	1	
		Engenheiro	2	
		Advogado	3	
		Técnico Agrícola	4	
		Técnico de Laboratório	5	
		Técnico de segurança do Trabalho	6	
		Vigilante	7	
		Preparador de Produtos químicos	8	
		Aplicador de Agrotóxicos	9	
		Preparador de mudas	10	
		Plantador	11	
		Irrigadores	12	
		Adubação	13	
		Desbaste	14	
		Eliminação de pencas ou falsa penca	15	
		Eliminação do coração	16	
		Limpeza do cacho	17	
		Escoramento das bananeiras	18	
		Desvio do cacho ou do "filho"	19	
		Rebaixamento do pseudocaulé (tronco)	20	
		Embolsamento de cachos	21	
		Marcador de cacho	22	
		Rebaixador inicial	23	
		Rebaixador final	24	
		Desfolha	25	
		Colhedor de frutas	26	
		Pós-colheita	27	
		Tratorista	28	
		Cozinheiro	29	
		Outros	30	
		(_____)	99	
		Não respondeu		

**PARTE 5 - CARACTERIZAÇÃO DA EXPOSIÇÃO DO TRABALHADOR**

503	Se na empresa que você trabalha existe uso de agrotóxicos (veneno), você tem algum contato com eles?	Sim	1	
		Não	2	→601
		Não sei	88	→601
		Não respondeu	99	→601
504	Qual é o tipo de contato que você tem com esses agrotóxicos (veneno)?	Direto (durante a atividade de trabalho)	1	
		Indireto (após aplicação, colheita, muda e outros)	2	
		Durante a pulverização aérea	3	
		Não sei	88	
		Não respondeu	99	

505	Em qual (ais) atividade(s) de trabalho você tem contato com agrotóxicos (veneno)?	Preparação de misturas 1 Pulverização costal 2 Pulverização aérea 3 Armazenamento 4 Descarte de embalagem 5 Limpeza de roupa 6 Limpeza do equipamento 7 Gotejamento contínuo 8 Transporte 9 Trabalho em área pulverizada 10 Embalagem do produto final 11 Outros 12 ( _____ ) 88 Não sei 99 Não respondeu	
506	Nos períodos de pulverização aérea, o seu contato com o veneno acontece:	Durante a pulverização, pois você permanece em sua função 1 Você ajuda a sinalizar para o avião com bandeira 2 Você entra no bananal logo após a pulverização 3 Você mora perto das áreas pulverizadas 4 Não sei 88 Não respondeu 99	
508	Quais são os agrotóxicos (veneno) que você tem contato?  OBS: os que estão grifados são herbicidas	Bayfidan EC 1 Bórax 2 Bravonil 500 3 <u>Carbofuran</u> 4 Cercobin 500SC 5 Cobre Atar BR 6 Comet 7 Cuprozeb 8 Domark 100EC 9 <u>Finale</u> 10 Flare 11 Folicur 200 CE 12 Fugiscan 700WP 13 Garant 14 <u>Gramocil</u> 15 <u>Gramoxone 200</u> 16 Ícarus 17 Impact 125SC 18 Juno 250CE 19 Manzate 800 20 Metiltiofan 21 Mythos 22 Nativo 23 Opera 24 Opus SC 25 Orius 250EC 26 <u>Roundup</u> 27 Score 28 <u>Scout NA</u> 29 Soprano 125SC 30 Soprano 25 EC 31 Stratego 250 EC 32 Sulfato de cobre 33 Support 34 Tango Cash 35 Tecto SC 36 Tilt 37 Triade 38 Triazol 39 Virtue 40 Outros ( _____ ) 41 Não sei 88 Não respondeu 99	
509	Há quanto tempo você trabalha com agricultura familiar?	Meses _____ Anos - Não sei _____ Não respondeu - 88 99	

510	Qual é a frequência com que você entra em contato com agrotóxicos (veneno)?	Diária – horas / dia Semanal - dia / semana Mensal – semana / mês Anual – meses/ano Não sei Não respondeu	—/— —/— —/— —/— 88 99	
511	Quantos dias ou horas faz que você teve o último contato com agrotóxicos (veneno)?	Menos de 12 horas de 12 a 24 horas de 1 a 7 dias Mais de 7 dias Não sabe Não respondeu	1 2 3 4 88 99	
512	Quais os agrotóxicos que você teve contato durante a Agricultura Familiar?	Indrec Folidol Folisuper Azodrin 2,4 – D Propanil Tamaron (Metamidofós)	1 2 3 4 5 6 7	
513	Quanto tempo você trabalhou com esses agrotóxicos?	Menos de 01 ano De 01 a 04 anos De 05 a 08 anos De 08 a 12 anos Mais de 12 anos Outro ( _____ ) Não sei Não respondeu	1 2 3 4 5 6 7 8	

#### **PARTE 6 - MEDIDAS DE CONTROLE DO RISCO ADOTADAS PELO TRABALHADOR**

613	Qual (ais) desta(s) medida(s) de prevenção você adota em seu trabalho. Pode marcar mais de uma alternativa						
		Freqüentemente	Às vezes	Nunca	NS	NR	
	Luvas	1	2	3	88	99	
	Máscaras	1	2	3	88	99	
	Lenço	1	2	3	88	99	
	Óculos	1	2	3	88	99	
	Chapéu	1	2	3	88	99	
	Botas	1	2	3	88	99	
	Macacão	1	2	3	88	99	
	Observação dos ventos	1	2	3	88	99	
Banho após o trabalho	1	2	3	88	99		
Nenhuma proteção	1	2	3	88	99		

#### **PARTE 9 – HISTÓRIA CLÍNICA DO TRABALHADOR**

901	Atualmente está com algum problema de saúde?	Sim Não Qual ( _____ ) Não sei Não respondeu	1 2 3 88 99	
902	Está tomando algum medicamento	Sim Não Qual ( _____ ) Não sei Não respondeu		

Entrevistador:

\_\_\_\_\_

Obrigado por ter participado

## APÊNDICE C

### 1 - Reuniões para aplicação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ao grupo de sujeitos envolvidos na pesquisa.



### 2 - Demonstração do procedimento de coleta de medula óssea



### 3 - Coleta de sangue periférico para hemograma



### 4 - Coleta de aspirado de medula óssea para análise citogenética



**5 – Posto de Saúde da comunidade onde foi realizada a coleta de amostras**



**6 – Grupo de profissionais envolvidos no trabalho de coleta das amostras**

