



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE MEDICINA CLÍNICA**  
**PROGRAMA DE MESTRADO ACADÊMICO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

**MARÍLIA BRAGA COSTA**

**ANÁLISE DE EXPRESSÃO DOS GENES DE REPARO DA LESÃO DE FITA SIMPLES  
DO DNA DE TRABALHADORES RURAIS EXPOSTOS À AGROTÓXICOS**

**FORTALEZA**

**2017**

MARÍLIA BRAGA COSTA

**ANÁLISE DE EXPRESSÃO DOS GENES DE REPARO DA LESÃO DE FITA SIMPLES  
DO DNA DE TRABALHADORES RURAIS EXPOSTOS A AGROTÓXICOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado 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 Mestre em Ciências Médicas.

Orientador: Prof. Dr. Ronald Feitosa Pinheiro

FORTALEZA

2017

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)

---

C874a Costa, Marília.  
ANÁLISE DE EXPRESSÃO DOS GENES DE REPARO DA LESÃO DE FITA SIMPLES DO DNA DE  
TRABALHADORES RURAIS EXPOSTOS A AGROTÓXICOS / Marília Costa. – 2017.  
118 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-  
Graduação em Ciências Médicas, Fortaleza, 2017.  
Orientação: Prof. Dr. Ronald Feitosa Pinheiro.

1. agrotóxicos. 2. lesões no DNA. 3. genes de reparo. 4. expressão gênica. I. Título.

CDD 610

---

MARÍLIA BRAGA COSTA

**ANÁLISE DE EXPRESSÃO DOS GENES DE REPARO DA LESÃO DE FITA SIMPLES  
DO DNA DE TRABALHADORES RURAIS EXPOSTOS A AGROTÓXICOS**

Tese apresentada ao Curso de Mestrado 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 Mestre em Ciências Médicas.

**Defesa em:** 15/02/2017

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof. Dr. Ronald Feitosa Pinheiro** (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará - UFC

---

**Dr. Howard Lopes Ribeiro Júnior**  
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira - UNILAB

---

**Dr. Manoel Odorico de Moraes**  
Universidade Federal do Ceará - UFC

---

**Dr. Carlos Henrique Moraes de Alencar**  
Universidade Federal do Ceará - UFC

*À Deus.  
Aos meus pais e irmão.  
Ao meu futuro esposo.*

## AGRADECIMENTOS

À **DEUS**, Senhor da minha vida, que tem me proporcionado viver este momento, me capacitado para concretizar esse trabalho e me dado o prazer, a satisfação de concluir mais essa fase da minha história.

Aos meus queridos pais **Francisco Welligton Caetano Costa** e **Antônia Maria Braga Costa** e ao meu irmão **Emanuel Marcel Braga Costa**, por serem o meu maior apoio, amparo e por todo amor e empenho dedicados a mim. Amo vocês!!!

Ao meu amado namorado (futuro esposo, se Deus assim permitir) **Matheus Henrique Santos Fernandes**, por toda compreensão, pelo ombro dedicado a enxugar tantas lágrimas, por acreditar tanto que tudo isso seria possível. Que a cada dia eu possa retribuir toda sua ajuda e carinho.

Ao meu orientador **Dr. Ronald Feitosa Pinheiro**, por ser um homem tão dedicado à sua profissão como médico, pesquisador e professor. Mas sobretudo, por todo direcionamento, orientação, conhecimento e exigência, essenciais para meu crescimento científico. Meus sinceros agradecimentos.

Ao **Howard Lopes Ribeiro Júnior**, por participar da banca de qualificação e defesa, por todas as vezes que se disponibilizou a ajudar, por todas as dúvidas elucidadas, por todas as sugestões oferecidas ao meu trabalho, meu muito obrigada.

Ao **Prof. Manoel Odorico de Moraes**, por prontamente aceitar participar da minha banca de defesa desta dissertação, contribuindo com toda sua experiência e conhecimento científico.

Ao **Prof. Carlos Henrique Moraes de Alencar**, que ao conhecer meu trabalho, aceitou participar da banca de defesa, portanto já agradeço por toda contribuição que será oferecida e somada a este trabalho.

À **Fabiola Fernandes Heredia**, que de imediato aceitou participar da banca de qualificação e que certamente irá trazer contribuições significantes para este trabalho.

À **Juliana Cordeiro de Sousa**, que nos primeiros anos no laboratório de citogenética tanto me ensinou e me ajudou a engajar nesse mundo que é a pesquisa científica, nunca deixarei de ser grata.

Em especial, as minhas amigas **Izabelle Rocha Farias** e **Daniella de Paula Borges**, por dividirmos esse momento, por nos apoiarmos e, por muitas vezes, sermos as únicas que entendiam o que estávamos passando, pelas boas risadas e sufocos compartilhados. Meu muito obrigada, vocês fizeram a caminhada ser mais leve. Que Deus abençoe vocês sempre!

À todos que fazem parte do **Laboratório de Citogenômica do Câncer**, pela compreensão, principalmente nos últimos meses em que não pude estar tão presente na rotina do laboratório, pelas risadas e momentos de descontração que a convivência no laboratório nos proporciona, por todo trabalho que com empenho é executado por todos.

Aos meus **familiares e amigos**, por compreenderem a ausência nesse último ano, por entenderem que nem sempre podia estar presente em aniversários e comemorações e pelas palavras de estímulo e conforto, que mesmo distante, se faziam presentes.

Ao Dr. **Luiz Ivando Pires**, que deu início junto com o Dr. Ronald a esse trabalho tão bonito com os agricultores de Limoeiro do Norte, obrigada pelas coletas de medula óssea que tornaram possível a realização desse estudo.

E, por fim, não menos importante, agradeço aos **trabalhadores rurais de Limoeiro do Norte** que, voluntariamente, doaram suas medulas para realização deste e tantos outros trabalhos, já executados e aqueles que ainda serão findados. Muito obrigada! E que todos esses resultados possam refletir na vida de vocês e de muitos outros agricultores.

*“Ó profundidade das riquezas, tanto da sabedoria, como da ciência de Deus! Quão insondáveis são os seus juízos, e quão inescrutáveis os seus caminhos! Por que quem compreendeu a mente do Senhor? Ou quem foi seu conselheiro? Ou quem lhe deu primeiro a ele, para que lhe seja recompensado? Porque dele e por ele, e para ele, são todas as coisas; glória, pois, a ele eternamente. Amém...”*

*(Apostolo Paulo, em Romanos 11:33-36.)*

## RESUMO

O crescimento da população e o surgimento da indústria química moderna culminou em mudanças significativas na produtividade agrícola. A necessidade de uma produção cada vez maior de alimentos tem estado atrelada ao uso de substâncias químicas afim de controlar e melhorar o desenvolvimento dos produtos agrícolas. No Ceará, especificamente na região do Baixo Jaguaribe, foi com a chegada da agricultura empresarial que houve uma reordenação do agronegócio na região. A exposição a pesticidas é muitas vezes considerada um fator importante subjacente ao aumento do risco de distúrbios da medula óssea, incluindo leucemia, síndrome mielodisplásica (MDS) e mieloma múltiplo em populações agrícolas. Os danos genéticos cumulativos são eventos importantes para o desenvolvimento da carcinogênese e a falta de eficácia no sistema de reparo do DNA é considerado um dos principais fatores contribuintes. Avaliamos a expressão gênica de alvos relacionados aos mecanismos de reparo do DNA, nomeadamente os genes de reparo de fita simples do DNA (SSB: CSA, CSB, XPA, XPC e XPG) utilizando PCR quantitativa em tempo real a partir de amostras de medula óssea de noventa agricultores. Além disso, também investigamos Cariótipo das células da medula óssea pela G-Band para confirmar as alterações citogenéticas. Os participantes foram recrutados no Limoeiro do Norte, um município no Nordeste do Brasil reconhecido pela intensa atividade agrícola e dividido em três grupos de acordo com seus segmentos de trabalho: grande produtor (GP), agricultura familiar (AF) e agricultura ecológica (AE). Houve diferenças significativas entre os três grupos. Os indivíduos do grupo GP apresentaram níveis de transcrição significativamente inferiores de *XPG* ( $p = 0,004$ ), *CSA* ( $p = 0,000$ ), em comparação com o grupo AO. Entre os agricultores expostos aos agroquímicos, descobrimos que aqueles com mais de 12 anos de exposição apresentaram uma diminuição geral da expressão de *XPC* ( $p = 0,001$ ), *XPG* ( $p = 0,010$ ) e *CSB* ( $p = 0,05$ ) em comparação com aqueles que foram expostos a menos de 12 anos. Além disso, detectamos correlações significativas ( $p < 0,05$ ) entre *XPC* e *CSB* ( $r = 0,658$ ), *XPC* e *XPG* ( $r = 0,641$ ), *XPA* e *CSB* ( $r = 0,635$ ), *XPA* e *XPG* ( $r = 0,627$ ), *XPG* e *CSA* ( $r = 0,536$ ), *CSA* e *CSB* ( $r = 0,515$ ), *XPA* e *XPC* ( $r = 0,496$ ), *XPA* e *CSA* ( $r = 0,327$ ). Embora essas correlações mostrem a relação intrínseca global entre os genes de fita simples e fita dupla do DNA nas células da medula óssea desses indivíduos, é certamente notável o fato de que a grande maioria dos genes de reparo de DNA investigados estavam baixo expressos em agricultores expostos à pesticidas, o que muito aumenta o risco de desenvolver câncer de medula óssea.

**Palavras chave:** agrotóxicos, lesões no DNA, genes de reparo, expressão gênica.

## ABSTRACT

Population growth and the arising of the modern chemical industry have culminated in significant changes in agricultural productivity. The need of a increasingly food production has been linked to the use of chemicals to control and improve the development of agricultural products. In Ceará, specifically in region of Baixo Jaguaribe, the arrival of business agriculture has caused a re-ordering of agribusiness. Exposure to pesticides is often considered a major factor underlying increased risk of bone marrow disorders, including leukemia, myelodysplastic syndrome (MDS) and multiple myeloma in agricultural populations. Cumulative genetic damages are important events for the development of carcinogenesis and lack of efficacy in the DNA repair system is considered a major contributing factor. We evaluated the gene expression of targets related to DNA repair mechanisms, namely genes from the classes single strand break (SSB: *CSA*, *CSB*, *XPA*, *XPC* and *XPG*), using quantitative real time PCR from bone marrow samples of ninety farmers. Further, we also investigated karyotype of bone marrow cells by G-Band to confirm cytogenetic alterations. The participants were recruited from Limoeiro do Norte, a municipality in the northeastern of Brazil recognized by its intense agriculture activity, and divided into three groups according to their work segments: agriculture industry (AI), family farmers (FF) and organic farming (OF). There were significant differences across the three groups. AI individuals presented significantly lower transcript levels of *XPG* ( $p=0.004$ ) and *CSA* ( $p=0.000$ ) compared to the OF group. Similarly, FF presented significantly lower *XPG* ( $p=0.012$ ) mRNA expression levels than OF. Among the farmers exposed to agrochemicals, we detected that those with more than 12 years of exposure showed an overall decrease in expression of *XPC* ( $p=0.001$ ), *XPG* ( $p=0.010$ ) and *CSB* ( $p=0.05$ ) compared to those who had been exposed to less than 12 years. In addition, we detected significant correlations ( $p<0.05$ ) between *XPC* and *CSB* ( $r=0.658$ ), *XPC* and *XPG* ( $r=0.641$ ), *XPA* and *CSB* ( $r=0.635$ ), *XPA* and *XPG* ( $r=0.627$ ), *XPG* and *CSA* ( $r=0.536$ ), *CSA* and *CSB* ( $r=0.515$ ), *XPA* and *XPC* ( $r=0.496$ ), *XPA* and *CSA* ( $r=0.327$ ). Whilst these correlations highlights the overall intrinsic relationship between single and double DNA strand breaks genes in bone marrow cells of these individuals, it is certainly notable the fact that the vast majority of the DNA repair genes investigated were downregulated in farmers exposed to pesticides, which vastly increments the risk of developing bone marrow cancers.

**Key words:** pesticides, DNA damage, repair genes, gene expression.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Classificação dos agrotóxicos de acordo com sua toxicidade.	22
<b>Figura 2:</b> Localização geográfica de Limoeiro do Norte entre os estados do Ceará e Rio Grande do Norte.	23
<b>Figura 3:</b> Ingredientes ativos utilizados na pulverização aérea na Chapada do Apodi e sua classificação toxicológica e ambiental.	25
<b>Figura 4:</b> Classificação e efeitos e/ou sintomas agudos e crônicos dos agrotóxicos.	27
<b>Figura 5:</b> Mecanismos celulares que ligam exposição a compostos químicos e câncer.	29
<b>Figura 6:</b> Lesões de DNA e suas principais vias de reparo.	32
<b>Figura 7:</b> Apresentação esquemática dos tipos de mecanismos de reparo em danos de fita simples de DNA.	33
<b>Figura 8:</b> Apresentação esquemática das etapas e das proteínas atuantes no mecanismo de reparo por excisão de nucleotídeo (NER).	37
<b>Figura 9:</b> Representação esquemática das vias do reparo por excisão de nucleotídeo (Nucleotide excision repair pathways – NER).	38
<b>Figura 10:</b> Representação esquemática dos procedimentos da citogenética por banda G.	44
<b>Figura 11:</b> Representação esquemática dos procedimentos de qPCR.	47
<b>Figura 12:</b> Organograma resumo das metodologias utilizadas neste estudo.	50
<b>Figura 13:</b> Distribuição dos grupos de produção dos agricultores e do controle avaliados nesse estudo.	51
<b>Figura 14.</b> Cariótipos de dois casos alterados avaliados nesse estudo.	57
<b>Figura 15:</b> Nível de expressão do gene <i>XPG</i> frente aos grupos de produção em que estão inseridos os agricultores rurais.	59
<b>Figura 16:</b> Nível de expressão do gene <i>XPG</i> para o grupo exposto (grande produtor e agricultura familiar) e grupo não exposto (agricultura ecológica).	60
<b>Figura 17:</b> Nível de expressão do gene <i>XPG</i> dos agricultores frente ao tempo de trabalho com exposição a agrotóxicos.	61

<b>Figura 18:</b> Nível de expressão do gene <i>XPG</i> quanto ao tipo de contato com agrotóxicos.	59
<b>Figura 19:</b> Nível de expressão do gene <i>XPG</i> frente ao consumo de bebida alcoólica.	60
<b>Figura 20:</b> Nível de expressão do gene <i>XPG</i> em relação ao hábito de fumar.	61
<b>Figura 21:</b> Nível de expressão do gene <i>XPG</i> frente a frequência do uso de máscara.	62
<b>Figura 22:</b> Nível de expressão do gene <i>XPG</i> quanto a frequência do uso de macacão.	63
<b>Figura 23:</b> Nível de expressão do gene <i>XPC</i> em relação ao tempo de exposição aos agrotóxicos.	64
<b>Figura 24:</b> Nível de expressão do gene <i>XPC</i> em relação ao consumo de bebida alcoólica.	65
<b>Figura 25:</b> Nível de expressão do gene <i>XPC</i> quanto ao tabagismo.	66
<b>Figura 26:</b> Nível de expressão do gene <i>XPC</i> quanto ao uso de máscara.	67
<b>Figura 27:</b> Nível de expressão do gene <i>XPA</i> em relação ao tabagismo.	68
<b>Figura 28:</b> Nível de expressão do gene <i>XPA</i> quanto ao tipo de contato ao agrotóxico.	69
<b>Figura 29:</b> Nível de expressão do gene <i>XPA</i> em relação a frequência do uso de máscara.	70
<b>Figura 30:</b> Nível de expressão do gene <i>CSB</i> frente ao tempo de exposição a agrotóxicos.	71
<b>Figura 31:</b> Nível de expressão do gene <i>CSB</i> frente ao tempo de exposição na agricultura estratificado.	72
<b>Figura 32:</b> Nível de expressão do gene <i>CSB</i> em relação ao tipo de contato.	73
<b>Figura 33:</b> Nível de expressão do gene <i>CSB</i> em relação ao consumo de bebida alcoólica.	74
<b>Figura 34:</b> Nível de expressão do gene <i>CSB</i> quanto ao tabagismo.	75
<b>Figura 35:</b> Nível de expressão do gene <i>CSB</i> frente ao uso de máscara.	76
<b>Figura 36:</b> Nível de expressão do gene <i>CSB</i> em relação ao uso de macacão.	77

<b>Figura 37:</b> Nível de expressão do gene <i>CSA</i> quanto aos grupos de produção no qual estão inseridos os agricultores rurais.	62
<b>Figura 38:</b> Nível de expressão do gene <i>CSA</i> para o grupo exposto (grande produtor e agricultura familiar) e grupo não exposto (agricultura ecológica).	63
<b>Figura 39:</b> Nível de expressão do gene <i>CSA</i> frente ao consumo de bebida alcoólica.	64
<b>Figura 40:</b> Nível de expressão do gene <i>CSA</i> em relação ao uso de máscara.	65
<b>Figura 41:</b> Nível de expressão do gene <i>XPG</i> frente os grupos em que estão inseridos os agricultores e o grupo controle saudável.	85
<b>Figura 42:</b> Nível de expressão do gene <i>XPG</i> frente os grupos em que estão inseridos os agricultores e o grupo controle saudável.	85
<b>Figura 43:</b> Esquema de caracterização dos principais resultados de expressão avaliados nesse estudo.	85
<b>Figura 44:</b> Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes <i>XPA</i> e <i>XPC</i> em agricultores rurais.	87
<b>Figura 45:</b> Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes <i>XPA</i> e <i>XPG</i> em agricultores rurais.	88
<b>Figura 46:</b> Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes <i>XPA</i> e <i>CSA</i> em agricultores rurais.	89
<b>Figura 47:</b> Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes <i>XPA</i> e <i>CSB</i> em agricultores rurais.	89
<b>Figura 48:</b> Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes <i>XPC</i> e <i>XPG</i> em agricultores rurais.	90
<b>Figura 49:</b> Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes <i>XPC</i> e <i>XPG</i> em agricultores rurais.	91
<b>Figura 50:</b> Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes <i>XPG</i> e <i>CSA</i> em agricultores rurais.	92
<b>Figura 51:</b> Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes <i>XPG</i> e <i>CSA</i> em agricultores rurais.	92
<b>Figura 52:</b> Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes <i>CSA</i> e <i>CSB</i> em agricultores rurais.	93
<b>Figura 53:</b> Nível de expressão do gene <i>XPG</i> frente os grupos em que estão	94

inseridos os agricultores e o grupo controle saudável.

**Figura 54:** Nível de expressão do gene *CSA* frente os grupos em que estão inseridos os agricultores e o grupo controle saudável.

95

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Função dos genes avaliados nesse estudo.	39
<b>Tabela 2:</b> Genes avaliados por qPCR envolvidos nos mecanismos de reparo em danos de fita simples do DNA.	46
<b>Tabela 3:</b> Características dos trabalhadores rurais dos três grupos avaliados no estudo.	53
<b>Tabela 4:</b> Frequência do fumo, frequência do consumo de bebida alcoólica e principais tipos de bebidas consumidas dos grupos expostos a agrotóxicos (grande produtor e agricultura familiar) e grupo não exposto (agricultura ecológica).	53
<b>Tabela 5:</b> Caracterização do trabalho e da exposição do trabalhador dos agricultores expostos a pesticidas (grande produtor e agricultura familiar).	55
<b>Tabela 6</b> Medidas de controle e do risco adotadas pelo trabalhador.	56
<b>Tabela 7:</b> Lista dos pesticidas mais citados pelos trabalhadores rurais	57
<b>Tabela 8:</b> Casos com resultado avaliados na citogenética clássica.	58

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>MO</b>	<i>Medula Óssea</i>
<b>DNA</b>	<i>Ácido desoxrrribonucléico</i>
<b>cDNA</b>	<i>DNA Complementar</i>
<b>RNA</b>	<i>Ácido ribonucléico</i>
<b>C</b>	<i>Citosina</i>
<b>G</b>	<i>Guanina</i>
<b>T</b>	<i>Timina</i>
<b>A</b>	<i>Adenina</i>
<b>PARA</b>	<i>Programa de Análise de Agrotóxicos em Alimentos</i>
<b>MAPA</b>	<i>Mninistério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento</i>
<b>SINITOX</b>	<i>Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas</i>
<b>IDA</b>	<i>Ingestão Diária Aceitável</i>
<b>IA</b>	<i>Igrediente Ativo</i>
<b>LMR</b>	<i>Limite Máximo Permitido</i>
<b>NA</b>	<i>Agrotóxico Não Autorizado</i>
<b>IBGE</b>	<i>Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística</i>
<b>OMS</b>	<i>Organização Mundial de Saúde</i>
<b>EPI</b>	<i>Equipamento de Proteção Individual</i>
<b>EPC</b>	<i>Equipamento de Proteção Coletiva</i>
<b>SSB</b>	<i>Single Strand Break</i>
<b>DSB</b>	<i>Double Strand-Break</i>
<b>NHEJ</b>	<i>Non-Homologous End-Join</i>
<b>HR</b>	<i>Homologous Recombination</i>
<b>NER</b>	<i>Nucleotide Excision Repair</i>
<b>BER</b>	<i>Base Excision Repair</i>
<b>MMR</b>	<i>Mismatch Repair</i>
<b>SRP</b>	<i>Short Patch Repair</i>
<b>LRP</b>	<i>Long Patch Repair</i>
<b>APE1</b>	<i>Apendonuclease</i>
<b>RPC</b>	<i>Fator de Replicação C</i>
<b>PCNA</b>	<i>Antígeno Nuclear de Proliferação Celular</i>

<b>CPDs</b>	<i>Dímeros de Pirimidina de Ciclobutano</i>
<b>6,4 PPs</b>	<i>Fotoprodutos Pirimidina 6-4 Pirimidona</i>
<b>ERCC1</b>	<i>Excision Repair Completing Group 1</i>
<b>RPA</b>	<i>Replication Protein A</i>
<b>CSA</b>	<i>Cockayne Syndrome A</i>
<b>CSB</b>	<i>Cockayne Syndrome B</i>
<b>TCR</b>	<i>Transcription Coupled Repair</i>
<b>GGR</b>	<i>Global Genom Repair</i>
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
<b>UVSSA</b>	<i>UV- Stimulated Scaffold Protein A</i>
<b>U5P7</b>	<i>Ubiquitin Specific Processing Protease 7</i>
<b>XP</b>	<i>Xeroderma Pigmentos</i>
<b>XPA</b>	<i>Xeroderma Pigmentos Group A</i>
<b>XPC</b>	<i>Xeroderma Pigmentos Group C</i>
<b>XPG</b>	<i>Xeroderma Pigmentos Group G</i>
<b>GTG</b>	<i>Tripsina Giemsa</i>
<b>NTC</b>	<i>Controle Negativo</i>
<b>REF</b>	<i>Referência</i>
<b>UBC</b>	<i>Ubiquitin C</i>
<b>HPRT1</b>	<i>Hypoxanthine Phosphoribo Syltransferase 1</i>
<b>FMRP</b>	<i>Faculdade de Ribeirão Preto</i>
<b>RPM</b>	<i>Rotações por minuto</i>
<b>M</b>	<i>Molar</i>
<b>OR</b>	<i>Odds-Ratio</i>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>18</b>
1.1.	Breve histórico da questão rural.....	18
1.2.	Agrotóxicos e sua problematização.....	19
1.3.	Agricultura no Vale do Jaguaribe.....	22
1.4.	Riscos toxicológicos dos agrotóxicos .....	25
1.5.	Efeito genotóxico dos agrotóxicos .....	27
1.6.	Lesões no DNA .....	28
1.7.	Mecanismo de reparo do DNA.....	30
1.7.1.	Mecanismos de Reparo de Fita Simples de DNA.....	33
1.7.1.2.	Reparo de erros de emparelhamento de bases.....	34
1.7.1.3.	Reparo por excisão de nucleotídeo.....	35
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>40</b>
2.1.	Objetivo geral.....	40
2.2.	Objetivos específicos.....	40
<b>3.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>41</b>
3.1.	Aspectos éticos.....	41
3.2.	Seleção de amostras da população de estudo .....	41
3.3.	Coleta de Dados.....	41
3.4.	Coleta das amostras .....	42
3.5.	Cariótipo por Banda G .....	43
3.6.	Análise da Expressão do mRNA por qPCR .....	44
3.6.1.	Extração de RNA Total.....	44
3.6.2.	Síntese de cDNA .....	45
3.6.3.	qPCR (PCR quantitativo em tempo real).....	45

3.6.4. Validação e definição dos genes endógenos utilizados nas análises dos dados de qPCR.....	48
3.6.5. Validação da qualidade, integridade e estabilidade do nível de expressão das amostras de cDNA dos agricultores avaliados.....	48
3.7. Variáveis analisadas .....	48
3.8. Análise estatística .....	49
3.8.1. Análises estatísticas para a avaliação dos dados de expressão gênica.....	49
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>51</b>
4.1. Caracterização dos agricultores.....	51
4.2. Citogenética Clássica .....	57
4.3. Análise da expressão dos genes de reparo de fita simples do DNA.....	59
4.3.1. Análise do nível de expressão do gene <i>XPG</i> .....	59
4.3.2. Análise do nível de expressão do gene <i>XPC</i> .....	67
4.3.3 Análise do nível de expressão do gene <i>XPA</i> .....	71
4.3.4. Análise do nível de expressão do gene <i>CSB</i> .....	74
4.3.5. Análise do nível de expressão do gene <i>CSA</i> .....	81
4.4 Análises de correlação entre os níveis de expressão dos genes relacionados aos mecanismos de reparo em danos de fita simples do DNA.....	87
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>94</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>102</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>103</b>
<b>APÊNDICE A.....</b>	<b>112</b>
<b>APÊNDICE B.....</b>	<b>113.</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1. Breve histórico da questão rural

O processo denominado “Revolução agrícola” no período neolítico foi caracterizado pela introdução da produção de alimentos pelo homem por meio da agricultura. Esse processo reduziu significativamente a coleta e a caça para alimentação, ofertando, conseqüentemente, um novo modelo de vida para homem, dando-o maior controle sob o meio ambiente e o abandono da vida nômade (CAMPOS; MIRANDA, 2005).

A partir disso, a humanidade incorporou a atividade agrícola em seu cotidiano ao longo da história, de modo que as civilizações tiveram que intervir e aprimorar sua forma de se relacionar com o meio ambiente. Com o início do cultivo de alimentos, várias condutas padrões tiveram que ser estabelecidas e esses procedimentos até hoje fazem parte da sociedade, como assentamentos fixos, domesticação de animais e plantas, divisão de trabalho e exercício do poder (CAMPOS; MIRANDA, 2005).

O processo de produção agrícola tem passado por uma série de transformações tecnológicas e organizacionais cujo resultado mais contundente tem sido o aumento da produtividade (JOBIM et al., 2010). Tal processo de expansão das terras destinadas ao cultivo e conseqüente aumento da produção teve início nos séculos XVIII e XIX, mas foi intensificado a partir da Segunda Guerra Mundial, caracterizando o século XX, entre outros aspectos, por um intenso e contínuo processo de mudança na área agrícola (SORJ, 2008).

Essas mudanças, com destino ao aumento da produtividade, estão intimamente relacionadas à três aspectos em particular. Primeiramente, mudanças tecnológicas caracterizadas pela substituição da mão de obra por maquinaria, grande responsável pelo êxodo rural; a segunda, início do uso de agrotóxicos no campo, intensificados após a Segunda Guerra Mundial; e por fim, a introdução dos organismos geneticamente modificados, os alimentos transgênicos (SILVA et al., 2005).

Ainda atrelada às mudanças que a produção do próprio alimento trouxe para o homem e à sociedade como um todo, está a chamada “Revolução Verde”. Movimento que teve início em meados de 1960 (ALBERGON; PELAEZ, 2007), evidenciado por ser um novo modelo tecnológico de produção agrícola que resultou no desenvolvimento de novas atividades de produção de insumos, como tratores, agrotóxicos, assim como produção de sementes melhoradas, sistemas de irrigação e maquinários modernos. A promessa era de que essa

revolução aumentaria a produção de alimentos em larga escala com o objetivo de erradicar a fome (ALBERGON; PELAEZ, 2007; AQUINO et al., 2007).

No Brasil, engatado a essa mesma proposta da “Revolução Verde”, a chegada de agrotóxicos está ligada ao pós-guerra, pois a utilização de substâncias químicas já era evidente desde antes a década de 1950 (SILVIA et al., 2004; AUGUSTO et al., 2005). Mas foi a partir da década de 1960 que a cultura do uso de agrotóxicos foi de fato implantada, quando o Plano Nacional do desenvolvimento (PND) adotado pelo governo obrigou os agricultores a comprarem uma cota definitiva de agrotóxicos, em troca eram oferecidos créditos agrícolas rurais (JOBIM et al., 2010).

Desde então, o uso de agrotóxicos aumentou substancialmente. De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a população rural corresponde a quase 32 milhões de pessoas e a população rural economicamente ativa, a 12 milhões de pessoas. E quanto a produção de agrotóxicos, o Brasil é o oitavo consumidor de agrotóxicos do mundo, com uma produção correspondente a 250 mil toneladas por ano (JOBIM et al., 2010; CARNEIRO et al., 2015).

O uso de agrotóxicos tem beneficiado agroindústrias e aumentado a produtividade, caracterizando a “modernização agrícola”, no entanto, tem provocado danos à saúde do homem e ao meio ambiente, assim como tem gerado manejo incorreto do solo, contaminação dos recursos hídricos, dentre outros (SILVA et al., 2005). Atentar para as consequências do contato a agrotóxicos, seja de forma direta ou indireta, é de suma importância para uma sociedade que aponta para o crescimento e desenvolvimento.

## **1.2. Agrotóxicos e sua problematização**

O homem tem provocado alterações no meio ambiente e gerado resíduos nesse processo que podem ser de natureza sólida ou podem ser contaminantes químicos potencialmente tóxicos para os seres vivos. Tais alterações têm mantido estreita relação com a saúde da população e com a propagação dos contaminantes pelo solo e pela água. Assim, uma das principais preocupações atuais é o uso indiscriminado de agrotóxicos na agricultura brasileira (AUGUSTO et al., 2012).

No Brasil, o termo agrotóxico e afins pode ser definido, segundo o Decreto Federal nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002, que regulamenta a Lei Federal nº 7.802, de 11 de julho de 1989, em seu Artigo 1º, Inciso IV, como:

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.

Os agrotóxicos podem ser classificados de diferentes maneiras, uma das formas mais comuns é ao tipo de praga em que destinam sua ação. Eles podem ser divididos em inseticidas, usados no controle de insetos, suas larvas e formigas; fungicidas para o combate de fungos; e herbicidas no combate a ervas daninhas. No mercado nacional existe uma concentração de agrotóxicos para essas categorias de produtos, os herbicidas representam 45% do total de agrotóxicos comercializados, enquanto os fungicidas respondem por 14%, inseticidas 12% e demais categorias por 29% (ANVISA; UFPR, 2012).

Outra forma de classificação dos agrotóxicos é quanto a sua toxicidade (ver figura 1). A Organização Mundial de Saúde (OMS) classifica em quatro graus os níveis de toxicidade dos agrotóxicos e o governo federal estabeleceu cores para orientar os trabalhadores quanto ao grau de cada um. É importante frisar que a toxicidade de uma substância tem correlação direta com frequência, duração da exposição, via de administração e também com a estrutura química do pesticida envolvido (CONCEISSÃO, 2003), caracterizando a grande variação de ação e toxicidade dos agrotóxicos.

Dentre os herbicidas comercializados no Brasil, alguns merecem destaque devido às suspeitas de mutagenicidade e carcinogenicidade envolvendo esses produtos, é o caso do paraquat, glifosato, triazinas e derivados do ácido fenoxiacético, como o 2,4 – D, muito utilizado em pastagens e plantações de cana-de-açúcar (CARNEIRO et al., 2015). Essas substâncias possuem efeitos adversos à saúde, estando relacionados com intoxicações e desenvolvimento de câncer, como é o caso do glifosato, um dos herbicidas mais utilizados nos Estados Unidos e no mundo, em que estudos demonstraram sua relação com o desenvolvimento de linfoma não Hodgkin e mieloma múltiplo (COX,2004; CLAPP, 2007).

Os organoclorados fazem parte do grupo de inseticidas de lenta degradação com capacidade de acumulação nos tecidos orgânicos, tendo poder de contaminação não apenas de forma direta, mas também por meio da cadeia alimentar, através da ingestão de alimentos e água contaminada (LIMA et al., 2009). Um exemplo é agrotóxico diclorodifenil tricloroetano (DDT), que foi banido de vários países desde a década de 1970. No Brasil, devido o possível potencial carcinogênico, muitos dos organoclorados tiveram seu uso e distribuição proibidos pela portaria nº 329, de 2 de setembro de 1985. No entanto, algumas substâncias foram

liberadas em caráter emergencial, como endossulfam e o dicofol (Portaria nº 95, de 21 de novembro de 1985).

Agrotóxicos que também são amplamente utilizados na agricultura são os organofosforados, carbamatos e piretroides, são inseticidas que podem ser facilmente absorvidos pelas vias digestiva, respiratória e cutânea. São distribuídos no organismo pela corrente sanguínea, sofrem biotransformação e também são responsáveis por intoxicações e danos ao organismo (MATOS *et al.*, 2002).

Em um estudo realizado pelo Programa de Análise de agrotóxicos em Alimentos (PARA) entre os períodos de 2013 a 2015, foi demonstrado que de 12.051 amostras de 25 alimentos de origem vegetal analisadas de 27 estados do Brasil, 2.371 (19,7%) apresentaram resultado insatisfatório. Além disso, 2.211 dessas amostras mostraram ingredientes ativos (IA's) que estão em processo de reavaliação toxicológica, não sendo autorizados para cultura (ANVISA 2015). Dentre os agrotóxicos com maior número de irregularidades encontrados na análise está o acefato, o carbendazim e o clorpirifós (ANVISA 2015).

O uso de agrotóxicos não autorizados ou em processo de reavaliação é bastante perigoso para o consumo, visto não ser considerado o cálculo da ingestão diária aceitável (IDA) e apresentar alto grau de toxicidade. Agrotóxicos como o endossulfam, metamidofos e o acetato, que são proibidos em vários locais do mundo, no Brasil há pressões do setor agrícola para que os mesmos sejam mantidos no mercado (CARNEIRO *et al.*, 2015). Dos 50 agrotóxicos mais utilizados em nossas lavouras, 22 são proibidos na União Europeia, 14 estão em processo de reavaliação e alguns com previsão para serem retirados do mercado (CARNEIRO *et al.*, 2015).

O Programa de Análise de agrotóxicos em Alimentos (PARA) afirmou que entre 2008 e 2010 o uso de agrotóxicos não autorizados (NA) e a presença de resíduos acima do limite máximo permitido (LMR) ainda é bastante evidente, ou seja, há necessidade de maiores medidas com destino a diminuir os riscos da utilização de agrotóxicos (CARNEIRO *et al.*, 2015), tanto para o trabalhador rural, quanto para a população em geral, que também assume esses riscos ao consumirem alimentos contaminados.

Os trabalhadores rurais no Brasil, que por vezes apresentam baixo nível de escolaridade, não passaram por nenhum treinamento para utilizar os pesticidas ou desconhecem a situação de risco e não utilizam equipamentos de proteção coletiva e individual para a aplicação e manipulação dos produtos (AUGUSTOS *et al.*, 2012; CASTRO; CONFALONIERI, 2005), são os mais carentes de medidas preventivas e meios que os protejam dentro do setor agrícola. Embora pesquisas internacionais e no Brasil tenham demonstrado os efeitos nocivos dos

agrotóxicos, a luta dos pesquisadores que investigam este problema com o aparato científico e jurídico que atuam junto com corporações industriais do setor químico ainda é muito acirrada, principalmente com o argumento de contestarem a validade de provas científicas contra seus produtos (LIMA et al, 2009). Demonstrando assim, a importância da continuidade e reforço aos estudos que corroborem para comprovar os danos que produtos químicos agrícolas podem causar.

Ressalta-se, ainda, a importância da ampliação de ações de monitoramento de resíduos, a fiscalização da qualidade, assim como a reavaliação toxicológica dos agrotóxicos. O objetivo é reduzir a exposição ocupacional e consequente danos à saúde dos trabalhadores e diminuir exposição dos consumidores às substâncias químicas de maior perigo (ANVISA, 2012).

**Figura 1.** Classificação dos agrotóxicos de acordo com sua toxicidade.

<b>CLASSE</b>	<b>TOXICIDADE</b>	<b>COR DA FAIXA</b>
I	Extremamente tóxico	Vermelha
II	Altamente tóxico	Amarela
III	Medianamente tóxico	Azul
IV	Pouco tóxico	Verde

Fonte: Adaptado do Ministério da Saúde, 2006.

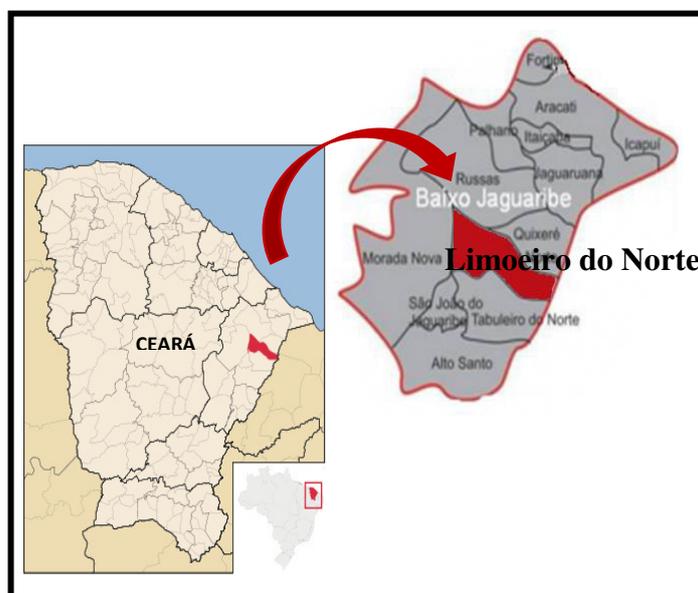
### 1.3. Agricultura no Vale do Jaguaribe

O Vale do Jaguaribe está localizado na região leste do estado do Ceará, onde localizam-se 80 municípios e está subdividido em três partes, no alto, médio e baixo Jaguaribe. Segundo o IBGE, o baixo Jaguaribe é composto pelos seguintes municípios: Alto Santo, Ibicuitinga, Jaguaruana, Limoeiro do Norte, Morada Nova, Palhano, Quixeré, Russas, São João do Jaguaribe e Tabuleiro do Norte (IBGE, 2012).

O baixo vale do rio Jaguaribe por muito tempo tem sido espaço de desenvolvimento de minifúndios com cultivo de frutas, algodão, cera de carnaúba e pecuária extensiva. Além disso, teve a atividade agrícola acentuada nos anos de 1980 por projetos de irrigação voltados ao combate à seca (CARNEIRO et al., 2015). Mas foi a chegada da agricultura empresarial que trouxe mudanças significativas na questão fundiária e econômica da região (RIGOTTO et al., 2013).

A cidade de Limoeiro do Norte, localizada entre o rio Jaguaribe e o rio Quixeré, no sopé da chapada do Apodi, está na divisa do Ceará e Rio Grande do Norte (Figura 2). Essa região se destaca pela grande produção agrícola e diversidade de culturas, como o cultivo de limão, abacaxi, uva, milho e mamão, dentre outros (IPECE, 2016; MILHOME et al., 2009). No entanto, sobressalta-se na região o agronegócio da banana, o qual faz uso das terras férteis do perímetro irrigado da Chapada do Apodi (RIGOTTO et al., 2011). O cultivo nessa área também é caracterizado por ser destinado ao mercado de importação e exportação, além de ser constituído por assentamentos, pequenos produtores e áreas de agroecologia (IPECE, 2016).

**Figura 2.** Localização geográfica de Limoeiro do Norte entre os estados do Ceará e Rio Grande do Norte.



A partir dos anos 1970, a mecanização e o uso de agrotóxicos já eram evidentes na região do Baixo Jaguaribe e a chegada da agricultura empresarial proporcionou uma reordenação da produção agrícola, inserindo um segmento de proletários rurais que conduziram a alterações nas condições sociais de vida e trabalho dos empregados do agronegócio. O modelo de produção destinado a investir em amplas extensões de terras para o cultivo de frutas passou a usar grandes quantidades de agrotóxicos, determinando a vulnerabilidade e os riscos da população (RIGOTTO et al., 2013).

Os trabalhadores expostos às substâncias químicas em grande escala no agronegócio, por vezes, também o fazem nas suas lavouras na agricultura familiar, sendo uma exposição múltipla de agroquímicos e sem critérios de escolha dos produtos (RIGOTTO et al., 2011).

Outro aspecto importante é a acentuada exposição por meio da pulverização aérea, que atinge tanto a área das plantações como áreas circunvizinhas, muitas vezes não obedecendo a instrução normativa n.2, de 3 de janeiro de 2008, estabelecida pelo MAPA, que define a distância mínima de 500m entre as áreas pulverizadas e áreas de habitação (CARNEIRO, 2015).

Outro agravante em relação à exposição desses trabalhadores é o fato de não disporem de equipamentos de proteção individual adequados durante o contato com as substâncias, e quando os têm, fica em questão a eficácia e as condições em que se encontram. Um dos equipamentos necessários e de suma importância é a máscara com filtro de carvão ativado, que evita a inalação do produto tóxico (VEIGA, 2007). No entanto, na maioria das vezes, esta máscara não está disponível pela empresa ou o pequeno produtor não possui condições para adquiri-la, expondo-o de forma mais desfavorável (RIGOTTO et al., 2011).

Ademais, tratando da pulverização aérea na região, é importante ressaltar que esta é uma forma de contaminação não apenas para o ser humano, como já mencionado antes, mas também para o meio ambiente. Rigotto (2013) afirma que apenas 32% dos agrotóxicos pulverizados permanecem nas plantas, o restante é dividido entre o que fica no solo (49%) e o que é levado pelo ar (19%). Também se mostra evidente a contaminação de reservas hídricas e dos lençóis freáticos, ocasionados pelo escoamento de águas contaminadas. Na figura 3 estão exemplificados ingredientes ativos de agrotóxicos utilizados na pulverização aérea na região e suas classes de periculosidade ao meio ambiente.

Em um estudo realizado pelo órgão estadual de recursos hídricos na região do aquífero Jandaíra, localizado na região limítrofe do Ceará e Rio Grande do Norte, foi possível detectar a presença de ingredientes ativos em 6 de 10 amostras de água do aquífero. Além disso, entre 23 amostras oriundas de coletas de águas subterrâneas e águas distribuídas para consumo, encontraram entre 3 e 12 amostras com a presença de agroquímicos (COGERH, 2002).

É sabido que os danos dos agrotóxicos atingem o meio ambiente, a população que mora próximo as áreas de cultivo, mas sobretudo, atingem os trabalhadores rurais. Um estudo realizado entre o período de 2007 a 2011 evidenciou que 97% dos trabalhadores do agronegócio e da agricultura familiar estudados estavam expostos a agrotóxicos, distribuídos entre herbicidas, inseticidas e fungicidas. Dentro desse grupo estavam 4 a 30 IA's constituídos por grupos químicos distintos, os quais 68,5% deles foram classificados como muito tóxico e extremamente tóxico (RIGOTTO et al., 2011).

**Figura 3.** Ingredientes ativos utilizados na pulverização aérea na Chapada do Apodi e sua classificação toxicológica e ambiental.

<b>Agrotóxicos/ grupo químico</b>	<b>Classe toxicológica</b>	<b>Classe ambiental</b>
Difenoconazol / Triazol	I - Extremamente Tóxico	II – Muito Perigoso e Altamente Persistente no Meio Ambiente
Epoconazole e Piraclostrobina/Triazol e Strobilurina Opera®	II - Muito Tóxico	II – Muito Perigoso e Altamente Persistente no Meio Ambiente
Piraclostrobina / Comet®	II - Muito Tóxico	II – Muito Perigoso e Altamente Persistente no Meio Ambiente

Fonte: MARINHO; CARNEIRO; ALMEIDA (2011).

Adaptado de CARNEIRO et al., 2015.

#### 1.4. Riscos toxicológicos dos agrotóxicos

Pesticidas ou agrotóxicos são reconhecidos por serem constituídos por componentes químicos que apresentam efeitos adversos na saúde humana (BOLOGNESI et al, 2011). A população em geral apresenta um grau de risco em relação ao uso de agrotóxicos, assim, moradores próximos a áreas agrícolas e moradores do meio urbano também se encontram sob risco devido à permanência de resíduos químicos oriundos dos agrotóxicos nos alimentos como carne, peixe, laticínios, frutas e verduras. (CARNEIRO et al, 2015). No entanto, trabalhadores empregados na produção de agroquímicos e no seu uso na agricultura mostram uma maior predisposição aos potenciais efeitos dos pesticidas a saúde humana, pois estão sujeitos a uma maior contaminação do que a população em geral (SAILOJA et al, 2006).

Visto que a exposição por agrotóxicos pode ocorrer pela via dérmica, digestiva, respiratória e também por contato ocular (THUNDIYIL, et al., 2008), é possível determinar quadros de intoxicação. Na intoxicação aguda, os sintomas surgem rapidamente, são fáceis de serem reconhecidos e diagnosticados, tendo um tratamento melhor definido. Diferente das intoxicações crônicas, em que o surgimento dos sintomas é tardio, mas que podem acarretar danos irreversíveis (ECOBICHON, 2001). Na figura 4, são apresentados os sintomas de intoxicação aguda e crônica de alguns dos principais grupos químicos de agrotóxicos.

Segundo o Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (SINITOX) foram registrados, no período de 2007 a 2011, 26.385 casos de intoxicações por agrotóxicos de uso

agrícola e, em relação ao número de óbitos, os agrotóxicos de uso agrícola corresponderam a 863 casos. Assim, apresentam um número maior de intoxicações e óbitos quando comparados com outros meios de intoxicação demonstrados pela mesma pesquisa. Casos de envenenamento e óbitos por agrotóxicos de uso doméstico foram de 13.922/29, respectivamente; produtos veterinários 5.212 intoxicações e 29 óbitos; e raticidas foram de 15.191 casos de envenenamento e 138 óbitos (BOCHNER, 2015).

Alguns IA's dos agrotóxicos, com base em seus efeitos agudos, são classificados como médio ou pouco tóxicos. Todavia, os efeitos a longo prazo que estes constituintes podem causar à saúde são manifestados em várias doenças (CARNEIRO, 2015). Desta forma, tanto o uso quanto a exposição crônica de agrotóxicos têm sido alvo de pesquisas, visto os efeitos patológicos ao ser humano.

Estudos têm demonstrado que a exposição a agrotóxicos pode atingir o sistema nervoso, causando desde alterações neurocomportamentais a encefalopatias ou suicídios; sistema respiratório, da asma à fibrose pulmonar; e ainda o sistema imunológico, endócrino e reprodutivo, podendo causar infertilidade masculina, aborto e malformações congênitas (REMOR et al, 2009; BOLOGNESI et al, 2011).

Além disso, a exposição a pesticidas tem sido associada com o aumento da incidência de câncer de pulmão, de bexiga, de estômago, de fígado e também com alterações na hematopoiese e danos no DNA que contribuem para o desenvolvimento da síndrome mielodisplásica, leucemias e linfoma não Hodgkin (SAILAJA et al, 2006; MILIGI et al, 2006; RIGOTTO et al, 2013).

**Figura 4.** Classificação e efeitos e/ou sintomas agudos e crônicos dos agrotóxicos

PRAGA QUE CONTROLA	GRUPO QUÍMICO	SINTOMAS DE INTOXICAÇÃO AGUDA	SINTOMAS DE INTOXICAÇÃO CRÔNICA
<b>Inseticidas</b>	Organofosforados e carbamatos	Fraqueza, cólicas abdominais, vômitos, espasmos musculares e convulsões	Efeitos neurotóxicos retardados, alterações cromossômicas e dermatites de contato
	Organoclorados	Náuseas, vômitos, contrações musculares involuntárias	Lesões hepáticas, arritmias cardíacas, lesões renais e neuropatias periféricas
	Piretroides sintéticos	Irritações das conjuntivas, espirros, excitação, convulsões	Alergias, asma brônquica, irritações nas mucosas, hipersensibilidade
<b>Fungicidas</b>	Ditiocarbamatos	Tonteiras, vômitos, tremores musculares, dor de cabeça	Alergias respiratórias, dermatites, doença de Parkinson, cânceres
	Fentalamidas	-	Teratogêneses
<b>Herbicidas</b>	Dinitroferóis e pentaclorofeno	Dificuldade respiratória, hipertermia, convulsões	Cânceres (PCP-formação de dioxinas), cloroacnes
	Fenoxiacéticos	Perda de apetite, enjoo, vômitos, fasciculação muscular	Indução da produção de enzimas hepáticas, cânceres, teratogêneses
	Dipiridilos	Sangramento nasal, fraqueza, desmaios, conjuntivites	Lesões hepáticas, dermatites de contato, fibrose pulmonar

Fonte: OPAS/OMS (1996).

Adaptado de CARNEIRO et al., 2015.

### 1.5. Efeito genotóxico dos agrotóxicos

O processo de carcinogênese, de modo geral, ocorre lentamente e caracteriza-se por mudanças funcionais na célula que culminam em um descompasso do seu ciclo replicativo, perda do controle da divisão celular, e que podem ser induzidas por agentes externos ou internos ao organismo (KOIFMAN; HATAGIMA, 2003; ADAD et al., 2015).

Os agentes indutores externos, ou ambientais, são carcinógenos químicos (solventes aromáticos; clorados; agrotóxicos), físicos (radiações ionizantes e não ionizantes; campos eletromagnéticos) e biológicos (vírus, microorganismos). Já os agentes indutores internos podem ser entre outros, hormonais, imunológicos e enzimáticos (RIBEIRO; SALVADORI; MARQUES, 2003).

A maioria das células, quando regularmente danificadas por agentes mutagênicos, principalmente de origem ambiental, buscam reconhecer e corrigir tais danos afim de manter a sua integridade genômica. Porém, devido à grande exposição e/ou manuseio errôneo a fatores carcinogênicos externos, os danos ao DNA podem não ser reparados, devido às alterações nos mecanismos de regulação e replicação celular, culminando no crescimento celular desregulado e câncer (DIZDAROGLU, 2015).

Os processos carcinogênicos induzidos por meio do uso de agrotóxicos possuem os mais variados mecanismos de genotoxicidade e promoção de tumores envolvendo mediadores hormonais, imunológicos e a produção de moléculas oxidantes (peróxidos), que são moléculas altamente instáveis com capacidade de modificar a estrutura de lipídeos e proteínas na membrana celular, alterando a permeabilidade celular (RODVALL; DICH; WIKLUND, 2003).

A maior parte dos agentes mutagênicos presentes nos agrotóxicos exibem um espectro de mutações característico, que depende de vários fatores, incluindo a natureza das alterações primárias no DNA como: modificações de base, mudanças nos resíduos de açúcar ou fosfato, quebras de filamentos, ou incorporações de bases modificadas, e os subsequentes efeitos secundários, causados pela resposta do organismo a estas modificações. Estes efeitos secundários podem incluir a ação de várias formas de reparo do material genético e a duplicação de filamentos filhos sobre moldes modificados (REIS et al., 2011).

Portanto, a relação entre a exposição aos agrotóxicos e sua potencialidade ao desenvolvimento do câncer está intimamente relacionado com a capacidade de agentes genotóxicos interagirem quimicamente com o material genético, formando adutos, gerando alterações oxidativas e ocasionando lesões na molécula de DNA, com consequências danosas em genes cruciais para manutenção da estabilidade genômica (KOIFMAN; HATAGIMA, 2003; ADAD et al., 2015).

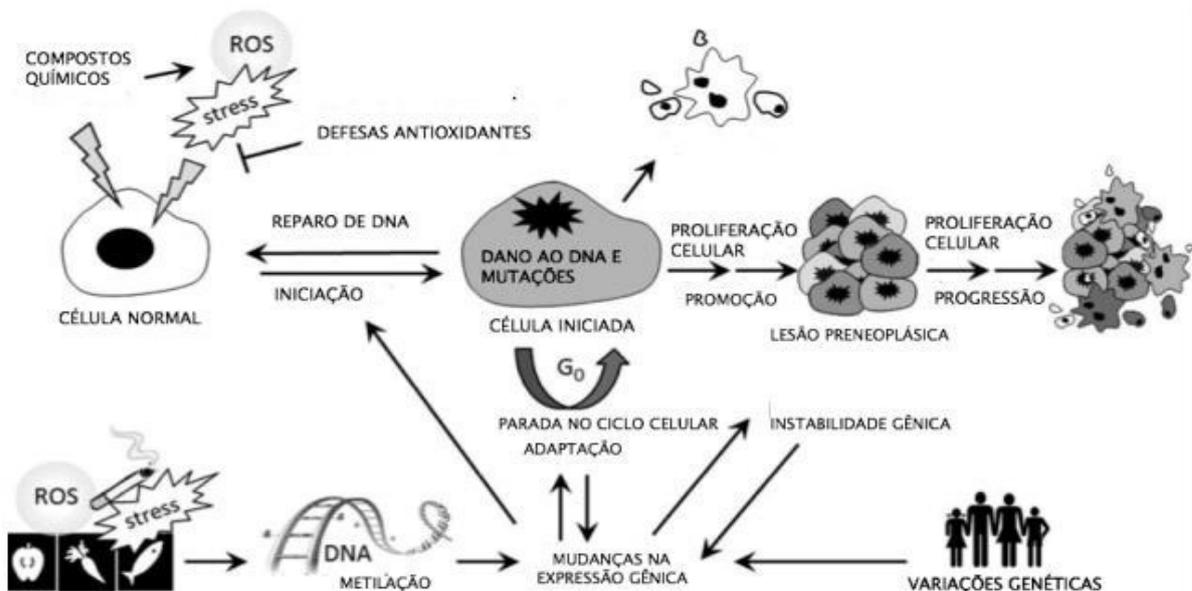
## **1.6. Lesões no DNA**

O genoma de todos os organismos estão constantemente sofrendo modificações, seja por moléculas reativas endógenas resultantes do metabolismo celular, da replicação e

recombinação do DNA, ou por fatores exógenos, como agentes físicos, químicos e biológicos (IYAMA e WILSON, 2013). Pesticidas são agentes químicos que demonstram um alto potencial genotóxico com capacidade mutagênica, nos quais podem acarretar danos ao DNA (BOLOGNESI, 2003). Esses danos no DNA quando não são corretamente reparados podem ocasionar um acúmulo de mutações em genes fundamentais para o metabolismo e crescimento celular normal (HOEIJMAKERS, 2009).

Estima-se que lesões endógenas ocorram milhares de vezes ao dia no genoma de todas as células humanas, no entanto, um sistema de reparo tenta impedir a persistência de tais lesões no DNA (LANGIE et al., 2015). Esse mecanismo de reparo equilibra a quantidade de danos que ocasionalmente ocorrem nas células para que, desta forma, mantenha a estabilidade e integridade genômica. Mas uma elevada frequência de mutações pode ocorrer ao genoma ocasionando modificações biológicas, nos quais são resultado de uma instabilidade genômica que ocorre quando vários processos envolvidos na manutenção e replicação do genoma não estão funcionando corretamente, como o próprio sistema de reparo do DNA, ou quando há uma relevante exposição a agentes carcinógenos (OZTURK e DEMIR, 2011; LANGIE et al., 2015), como mostrado na figura 5.

**Figura 5.** Mecanismos celulares que ligam exposição a compostos químicos e câncer.



Fonte: Adaptado de Langie et al. (2015).

As respostas aos danos no DNA podem ser definidas como uma rede de vias de sinalização na qual as lesões no DNA atuam como um sinal inicial que é detectado por

proteínas sensores e transmitido aos efetores por transdutores de sinais. Portanto, fenótipos celulares causados por estresse genotóxico são reconhecidos por essa cascata de sinalização controlada por um conjunto de proteínas. (SO; OUCHI, 2014).

Existem várias linhas de defesa contra a indução e persistência de dano ao DNA de uma célula. Primariamente, existem os agentes que previnem a formação do dano como peptídeos detoxificantes e os antioxidantes, como vitamina C e E. Secundariamente, há vias de resposta ao dano no DNA que removem um erro já existente através de vias de reparo de DNA reduzindo assim a possibilidade de indução de mutações. E, por fim, existe a célula já lesada que pode ser eliminada através de morte espontânea ou apoptose (OZTURK e DEMIR, 2011).

Portanto, uma célula que acumulou uma porção de danos em seu DNA e que não possui suas linhas de defesa contra a persistências de tais erros em correto funcionamento pode entrar em três possíveis situações: senescência, apoptose ou desenvolvimento de um tumor. Assim, vários sinais de danos ao DNA e vias de reparo podem ter impacto significativo no prognóstico e tratamento para vários cânceres (LIN et al, 2016).

### **1.7. Mecanismo de reparo do DNA**

O sistema de reparo do DNA é um dos processos de maior importância para a maioria dos organismos vivos e está constantemente ativo, respondendo aos danos na estrutura do DNA por meio de vários mecanismos. Sua atividade é relevante tanto para células precursoras que estão em proliferação quanto para células já diferenciadas, no qual objetiva manter a integridade dos indivíduos e garantir estabilidade genômica, que conseqüentemente é essencial para manter a viabilidade e longevidade de um organismo (OZTURK; DEMIR, 2011, IYAMA; WILSON, 2013, TORGASHEVA et al, 2016).

O mecanismo de reparo do DNA está dividido em duas grandes vias, dependendo se a lesão acometa a fita simples ou atinja a dupla fita do DNA. A partir destas vias há subdivisões de acordo com o tipo de lesão que possa acometer o genoma. Para lesões na dupla fita do DNA (*Double Strand-Break* - DSB), os mecanismos atuantes poderão ser a Recombinação Homóloga (HR) e a Junção de Extremidades Não Homólogas (NHEJ) (BRENERMAN et al., 2014; JUNIOR et al., 2015).

As DSB's são lesões consideradas tóxicas e mutagênicas, visto ocorrer a quebra de estruturas de fosfato nas duas cadeias de DNA simultaneamente, sendo consideradas formas mais citotóxicas de lesão (MEHTA; HABER, 2014; JUNIOR et al., 2015). Além disso, são

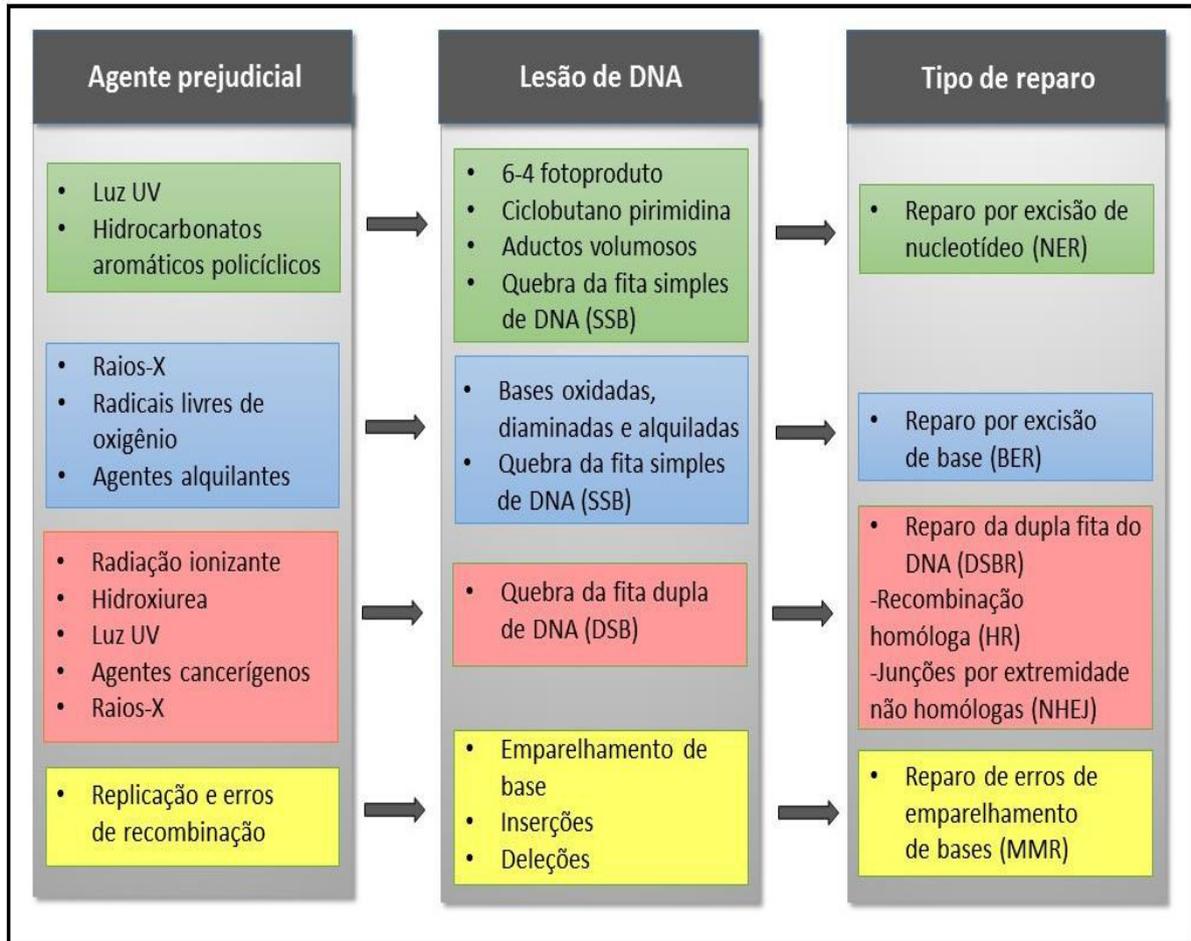
bastante relevantes quanto à formação de aberrações cromossômicas e morte celular, desencadeando no processo de instabilidade do genoma (JUNIOR et al., 2015).

O mecanismo NHEJ é caracterizado por atuar na junção das pontas quebradas das fitas, sendo assim considerada uma via não livre de erro, já que não usa uma fita como molde, logo, está bastante associado ao acometimento de anormalidades cromossômicas (JEPPESEN et al., 2011; BOULEY et al., 2015). No caso do mecanismo por HR, para unir as DSB's faz-se o uso de uma fita de DNA homólogo como molde, e como consequência, esse tipo de reparo está menos propenso a erros e promove maior fidelidade (JEPPESEN et al., 2011; IYAMA; WILSON, 2013). Diversas doenças humanas derivam de deficiências em HR e NHEJ e exibem defeitos no desenvolvimento imunológico e neurológico, assim como sensibilidade à radiação, fenótipos de envelhecimento precoce e predisposição ao câncer (IYAMA e WILSON, 2013).

Quando há a presença de lesões na fita simples do DNA (SSB), os mecanismos atuantes poderão ser Reparação de Erros de Emparelhamento de Bases do DNA (MMR), Reparação por Excisão de Bases (BER) e Reparação por Excisão de Nucleotídeos (NER) (BRENERMAN et al, 2014; JUNIOR et al, 2015). Desta forma, todas essas vias de reparo são fundamentais para manutenção da estabilidade genômica e viabilidade dos organismos, visto que as células estão constantemente sofrendo danos. Essas lesões podem ser por fonte endógenas, como espécies reativas de oxigênio e fontes exógenas, produtos mutagênicos, como agrotóxicos, e radiação (SAILAJA et al, 2006; JEPPESEN et al., 2011). A figura 6 sintetiza os principais agentes danificadores do DNA, as lesões que causam e as consequentes vias de reparo responsáveis pela remoção e reparação das lesões de DNA.

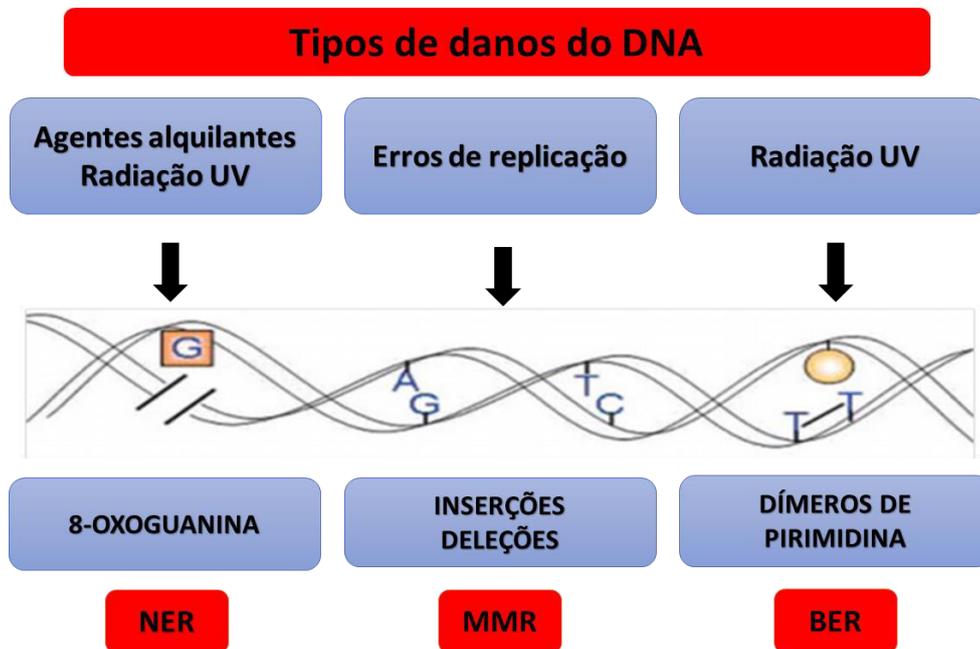
**Figura 6.** Lesões de DNA e suas principais vias de reparo

Fonte: Adaptado de Jeppensen et al. (2011).



### 1.7.1. Mecanismos de Reparo de Fita Simples de DNA

**Figura 7.** Apresentação esquemática dos tipos de mecanismos de reparo em danos de fita simples de DNA.



Legenda: NER Nucleotide Excision Repair; MMR DNA Mismatch Repair; BER Base Excision Repair.

Fonte: Adaptado de Boland et al. (2005).

#### 1.7.1.1. Reparo por excisão de base

O reparo por excisão de base (Base Excision Repair – BER) atua nas classes mais abundantes de lesões espontâneas e induzidas que ocorrem no DNA e está destinado à maioria das lesões devidas à processos endógenos ou àqueles induzidos por exposição a agentes químicos exógenos ou radiação (TORGASHEVA et al., 2016; DIANOV e HUBSCHER, 2013). O termo BER, originalmente, foi destinado a um conjunto de processos enzimáticos que realizam o reparo de bases de DNA modificados quimicamente, como danos de hidrólise, danos oxidativos e danos alquilantes. Esses danos são inevitáveis, visto que são produtos naturais da instabilidade do genoma ou que são produtos de reações com agentes intracelulares produzidos naturalmente (BRENERMAN et al., 2014).

A maquinaria de reparo por excisão de base reconhece bases danificadas que, na maioria das vezes, não causam distorção significativa a hélice do DNA. Além disso, tem como característica ser eventualmente iniciado por uma das várias glicosilases existentes, que reconhecem e dão início ao processo de BER com o objetivo de remover o nucleotídeo danificado (SPRY et al., 2007; WILSON et al., 2011). Lesões removidas do DNA por BER podem incluir uracil incorporados, pirimidinas fragmentadas, purinas N-alquiladas (7-metilguanina, 3-metiladenina, 3-metilguanina), 8-oxo-7,8-dihidroguanina (8-OxoG), timinaglicol e muitas outras (WILSON et al., 2011).

BER pode ser descrito em três etapas, primeiramente, há o reconhecimento de bases alteradas ou inadequadas por meio das glicosilases que clivam nucleotídeos anormais por hidrólise da ligação N-glicosilica entre a base e a desoxirribose, formando um sítio abásico. Por conseguinte, sítios apurínicos (perda de Adenina ou Guanina) ou apirimidínicos (perda de Timina ou Citosina) – (AP) são removidos por um AP-endonuclease ou AP-liase, que cliva o DNA na porção 5' ou 3' para o local AP, respectivamente. E então ocorre a excisão da base danificada. Neste momento o duplex de DNA está intacto, ou seja, não há quebras na estrutura de fosfodiéster, mas há a ausência da base danificada, e por fim, ocorre a correção da região por meio de uma DNA polimerase e ligação da cadeia por uma DNA ligase (SPRY et al., 2007; TORGASHEVA et al., 2016).

O mecanismo de BER é composto por duas vias: uma curta (Short-Patch Repair – SRP) e uma longa (Long-Patch Repair – LRP) (OZTURK; DEMIR, 2011; BRENERMAN et al., 2014). Na via curta, apenas um nucleotídeo é excisado pela DNA glicosilase e então uma AP endonuclease (APE1) forma as extremidades de DNA necessárias ao início do processo de síntese. Após isso a polimerase  $\beta$  acuradamente insere o nucleotídeo correto ao sítio abásico. Finalmente, a ligação é feita pela enzima DNA ligase III. No mecanismo de via longa, vários nucleotídeos (de 2 a 10) são excisados e então as bases corretas são inseridas pelas enzimas polimerase  $\delta$  e  $\epsilon$  em cooperação com o fator de replicação C (RPC) e o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA). Finalmente, as extremidades livres são seladas pela DNA ligase I (DIZDAROGLU, 2015).

### **1.7.1.2. Reparo de erros de emparelhamento de bases**

O reparo de emparelhamento de bases (Mismatch repairs – MMR), assim como os outros mecanismos de reparo, é essencial para a manutenção da estabilidade genômica (HERMANS et al., 2016), sua funcionalidade está na remoção de bases mal pareadas formadas por agentes exógenos e endógenos que causam deaminação, oxidação e metilação de bases, além de erros

de pareamento decorrentes de inserções, deleções e erros de replicação (OZTURK; DEMIR, 2011).

Os erros no processo de replicação do DNA podem incorporar um nucleotídeo errado a cada 10<sup>7</sup> adições e cerca de 0,1% desses erros gerados não conseguem ser reparados pelo sistema MMR e podem levar a mutações (FISHEL, 2015). Além disso, o mau funcionamento do mecanismo MMR pode resultar em um aumento de 100 a 1000 vezes nas taxas de mutações espontâneas (HERMANS et al., 2016).

O mecanismo MMR inclui passos significativos para remoção do dano no DNA, como o reconhecimento da lesão, discriminação de fita, excisão e reparo (RICHMAN, 2015). Três proteínas atuantes neste reparo, MutS, MutL e MutH, estão envolvidas no processo de reconhecimento da incompatibilidade das bases e na incisão endonucleotídeo da cadeia de DNA recém-sintetizada (HERMANS et al., 2016). Em mamíferos, as proteínas homólogas MutS (MSH1-6, MLH1 e MLH3) e MutL (PMS1 e PMS2) são responsáveis pelo reconhecimento dos locais com erros de pareamento. Em seguida, as bases mal pareadas são excisadas pela enzima exonuclease I e por fim os nucleotídeos que faltam são sintetizados corretamente pela enzima polimerase  $\delta$  (OZTURK; DEMIR, 2011).

Defeitos na via MMR estão associados a síndrome de Lynch em humanos, e também resultam em instabilidade de microssatélites, que podem ocorrer em 15% dos cânceres colorretais. Além disso, podem estar envolvidos em cânceres de endométrio, ovário, estômago e melanoma (RICHMAN, 2015; HERMANS et al., 2016).

### **1.7.1.3. Reparo por excisão de nucleotídeo**

O reparo por excisão de nucleotídeo (Nucleotide Excision Repair – NER) é um mecanismo de reparo multiproteico capaz de corrigir danos no DNA que causam distorção em sua hélice, compreende lesões que abrangem segmentos de 24 a 30 nucleotídeos na fita simples do DNA (SPRY et al., 2007; ROUILLON e WHITE, 2010; DIZDAROGLU et al., 2015). O sistema NER é altamente conservado e conta com a participação de 30 proteínas. Atua principalmente em danos induzidos por radiação UV, como dímeros de pirimidina de ciclobutano (CPDs) e fotoprodutos pirimidina 6-4 pirimidona (6-4 PPs), mas também por um grande número de agentes químicos exógenos, incluindo agentes ambientais como benzopirenos e quimioterápicos como a cisplatina (SCHARER, 2013; MARTEIJN et al., 2014).

A via NER contém uma gama de proteínas atuantes em seu mecanismo e apresenta como principais participantes sete proteínas que compõem o Xeroderma Pigmentosum complementation group, de XPA a XPG, a proteína Excision Repair Complementing group 1 (ERCC1), a proteína homóloga humana da levedura RAD23 (hHR23B), a Replication Protein A (RPA), as subunidades do Transcription Factor que possui atividade helicase (TFIIH) e as proteínas Cockayne Syndrome A and B (CSA e CSB) (BARAKAT; GAJEWSKI; TUSZYNSKI, 2012; BUDDEN e BOWDEN, 2013).

O mecanismo NER envolve três etapas (Figura 8), o reconhecimento de danos e consequente recrutamento de um complexo proteico de reparo para o local danificado, seguido da incisão na porção danificada dos nucleotídeos com posterior excisão da lesão no DNA. Por fim, a DNA polimerase promove a síntese da região excisada, utilizando a fita não danificada como molde, seguida da ligação da fita por meio de uma DNA ligase (SPRY et al., 2007; BUDDEN; BOWDEN, 2013).

Em eucariotos, NER pode ser descrito em duas formas que diferem entre si, basicamente, pela forma de reconhecimento da lesão. Existe o reparo acoplado a transcrição (Transcription-Coupled Repair - TCR), em que remove especificamente lesões de fita transcrita de genes ativos e há o reparo global do genoma (Global Genome Repair - GGR), que remove lesões em qualquer parte do genoma (MARTEIJN et al., 2014; ALEKSEEV; COIN, 2015).

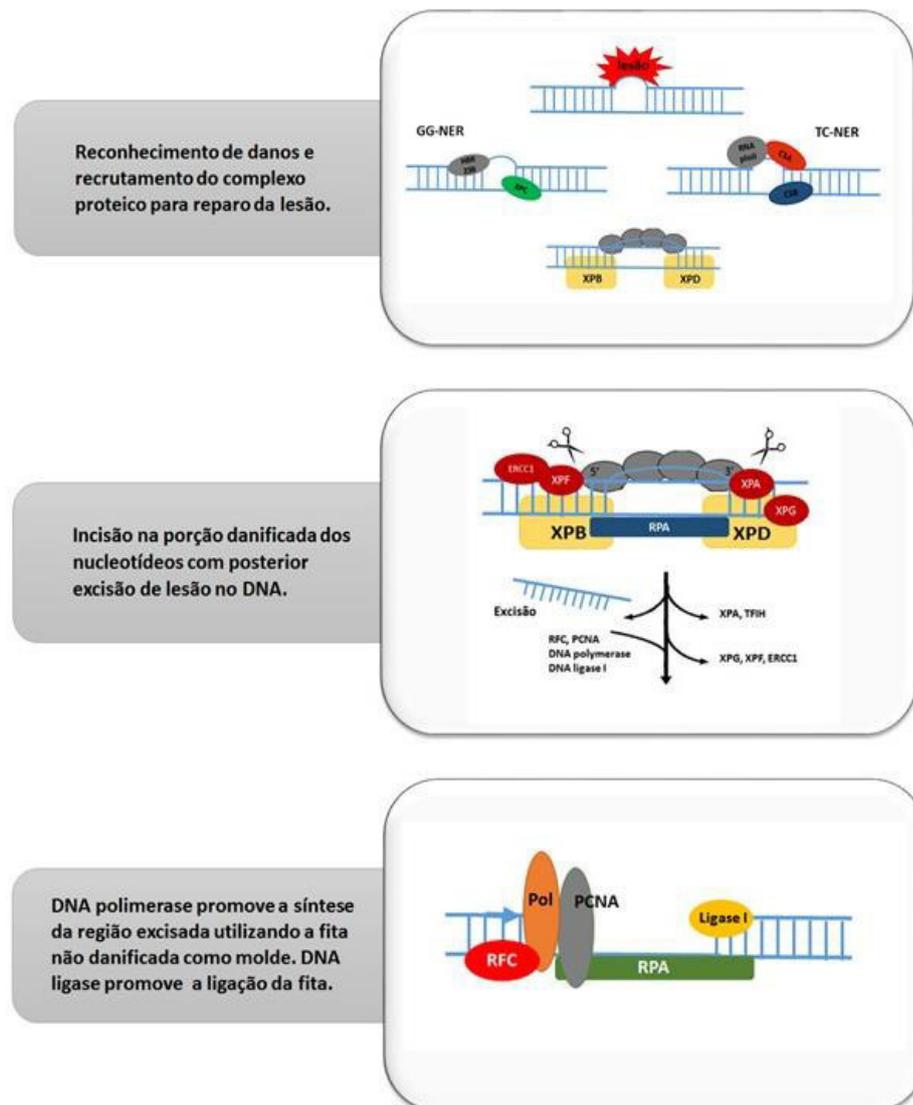
O GGR tem seu mecanismo ativado quando ocorre a detecção de lesões que causam distorção da hélice do DNA e então acontece ligação dos complexos UVRAD23, CETN2 e o sensor de dano XPC, que com ajuda do complexo UVDDDB reconhecem o dano e se ligam aos pares de base alterados. Já no processo de TCR as lesões são detectadas quando a lesão altera a fita de DNA e isto promove o bloqueio da RNA polimerase II. Tal polimerase é afastada permitindo com que a lesão seja acessível ao mecanismo de reparo. Para isto estão envolvidas as proteínas CSA e CSB, que atuam junto com UV-stimulated scaffold protein A (UVSSA) e Ubiquitin-specific-processing protease 7 (USP7) (MARTEIJN et al., 2014; ALEKSEEV e COIN, 2015).

Os processos GGR e TCR continuam, no entanto, entram numa mesma via comum onde um complexo multiprotéico, que inclui o TFIIH, é recrutado para ambos os processos. XPB e XPD atuantes nesse complexo agem gerando relaxamento do DNA ao redor da lesão, o que permite que o subcomplexo XPA-RPA confirme a presença do dano e estabilize-o para a excisão das bases. Então, o complexo ERCC1-XPF endonuclease é direcionado para atuar no processo de excisão de cerca de 24 a 30 bases que contém a lesão, neste momento XPG é

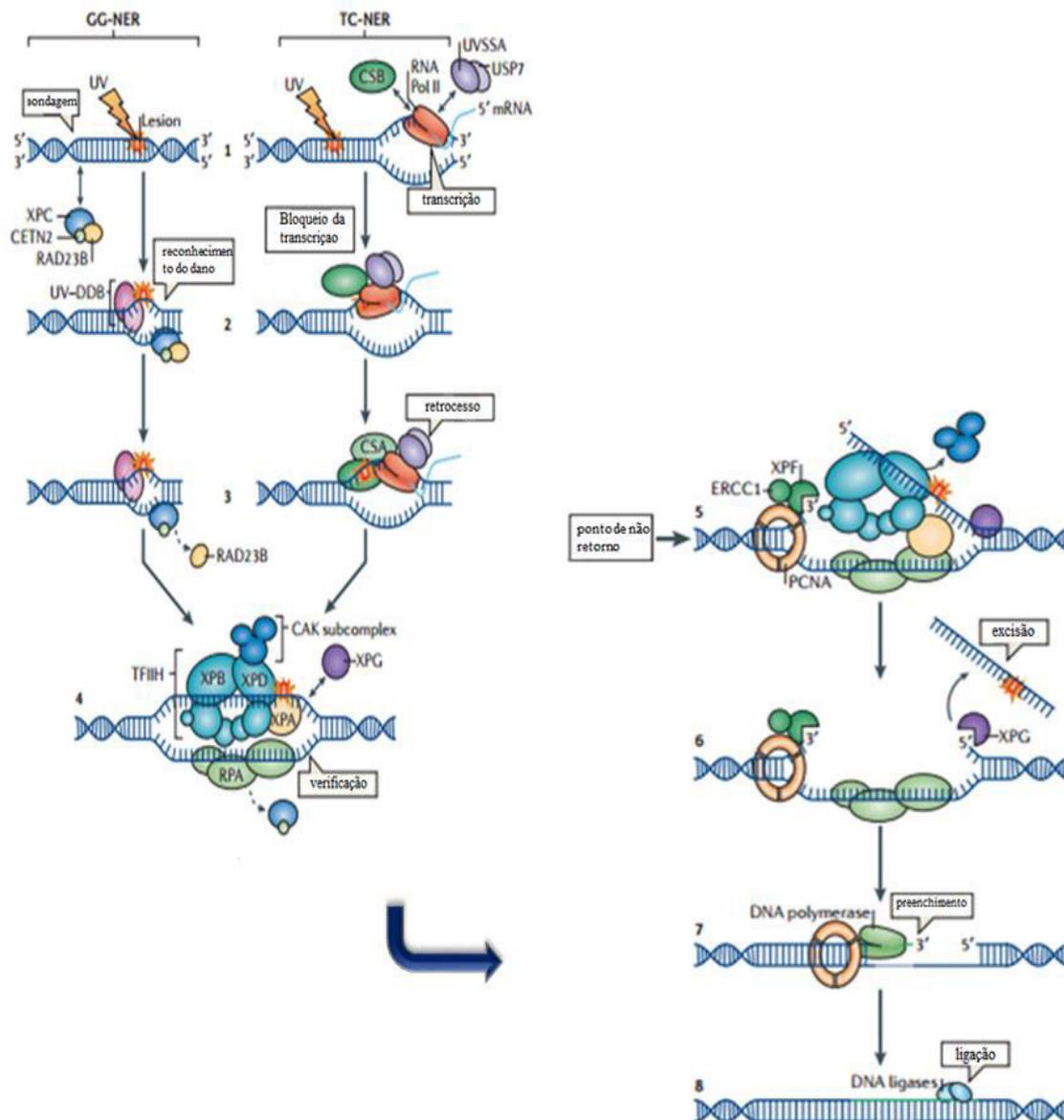
ativado para cortar e permitir a excisão do dano. Segue-se com o recrutamento das proteínas RFC, RPA, PCNA e das polimerases  $\beta$  e  $\epsilon$  para realizar a síntese do novo DNA. Finalmente, a fita é selada pela XRCC1-DNA ligase III (LIG3) ou pela FEN1-DNA ligase I (LIG1) (FOUSTERI e MULLENDERS, 2008; MARTEIJN et al., 2014). O mecanismo completo da via NER apresenta-se ilustrado na figura 9.

Defeitos funcionais nos genes das proteínas associadas ao NER são relacionados a certas doenças como o Xeroderma Pigmentoso e síndrome de Cockayne's, além de vários tipos de cânceres (IYAMA e WILSON, 2013; PERERA et al., 2016).

**Figura 8.** Apresentação esquemática das etapas e das principais proteínas atuantes no mecanismo de reparo por excisão de nucleotídeo (NER).



**Figura 9.** Representação esquemática completa das vias do reparo por excisão de nucleotídeo (Nucleotide excision repair pathways – NER).



LEGENDA: Duas vias do NER em mamíferos: GG-NER (Genome Global Repair) e TC-NER (Transcription-Coupled Repair). (1-3) O complexo XPC-RAD23B reconhece a mudança estrutural induzida pelo dano ao DNA como primeiro passo do GG-NER. TC-NER é iniciado por bloqueio da RNA polimerase II (RNAP) pela lesão, a qual bloqueia a transcrição de um gene ativo. Após esses passos de reconhecimento inicial, as duas vias envolvem os mesmos componentes proteicos. (4) Seguindo o reconhecimento, o complexo TFIIH é recrutado. Através da atividade das helicases XPB e XPD, TFIIH promove a abertura da fita dupla de DNA ao redor da lesão, facilitando o recrutamento de XPA e RPA. (5) O complexo XPF-ERCC1 é recrutado para a lesão através de interação direta com XPA, enquanto XPG é especificamente engajada através de interação com TFIIH. (6-7) As duas endonucleases, XPF-ERCC1 e XPG removem o fragmento oligonucleotídico que contém o dano e a DNA polimerase se encarrega de realizar a síntese de reparo em cooperação com RFC e PCNA. (8) Finalmente a abertura é selada tanto pelo complexo XRCC1-LIG3 como pelo FEN1-LIG1. (FONTE: Adaptado de MARTEIJN et al., 2014)

A pesquisa e elucidação de genes de reparo do DNA são bastante significativos para a Medicina, visto a importância para a saúde humana da manutenção de tais mecanismos de reparo do DNA e uma vez que agrotóxicos são associados à mutações nesses genes. Na tabela 1 se encontra, de forma resumida, as principais funções dos genes de reparo relacionado aos danos de fita simples avaliados neste estudo.

**Tabela 1.** Função dos genes avaliados nesse estudo.

GENES	FUNÇÕES
<i>XPC</i>	Proteína de ligação ao DNA que reconhece lesões UV no GGR e recruta proteínas de reparo. Pode detectar facilmente danos 6-4 PPs com o auxílio de <i>XPE</i> .
<i>XPA</i>	Verificação de dano que foi reconhecido e marcado por <i>XPC</i> e <i>XPE</i> e complexo <i>TFIIH</i> . Permite ligação do complexo <i>XPF-ERCC1</i> .
<i>XPG (ERCC5)</i>	Endonuclease que faz a primeira incisão 3' a lesão UV.
<i>CSA (ERCC8)</i>	Junto com <i>CSB</i> , desloca RNA polimerase e age para recrutar proteínas de reparo.
<i>CSB (ERCC6)</i>	Junto com <i>CSA</i> , desloca RNA polimerase e age para recrutar proteínas de reparo.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Avaliar o nível de expressão dos genes operantes no mecanismo de reparo em danos de fita simples no DNA de trabalhadores rurais expostos ou não a agrotóxicos.

### **2.2. Objetivos específicos**

1. Avaliar a expressão do mRNA dos genes de reparo do DNA de fita simples por PCR em tempo real (qPCR) em amostras de medula óssea de agricultores rurais (oriundos de grandes produtores agrícolas, de agricultura familiar e agricultura ecológica) e de indivíduos saudáveis inseridos no grupo controle.
2. Detectar as alterações cromossômicas pelo estudo do cariótipo por banda G em cultura de curta duração *in vitro* da medula óssea dos agricultores.
3. Associar o nível de expressão dos genes de reparo de danos de fita simples no DNA com o resultado citogenético.
4. Associar o nível de expressão dos genes de reparo de danos de fita simples no DNA com as variáveis estabelecidas à partir do questionário avaliativo.
5. Associar e comparar o nível de expressão dos genes de reparo de danos de fita simples no DNA dos agricultores com os controles saudáveis.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Aspectos éticos**

A presente pesquisa foi submetida e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Hospital Universitário Walter Cantídio, através do sistema da Plataforma Brasil com protocolo de nº 016.02.11. Foi utilizado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), no qual está demonstrado na sessão apêndice deste projeto (Apêndice A).

Nestes termos, a equipe executora desta pesquisa comprometeu-se a cumprir todas as diretrizes e normas reguladoras descritas na Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde que aprova as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos.

#### **3.2. Seleção de amostras da população de estudo**

Neste estudo foram incluídas 90 amostras de *pool* celular de medula óssea de agricultores que trabalhavam no município de Limoeiro do Norte – CE. O município encontra-se localizado no Nordeste do Brasil, no semi-árido do estado do Ceará, mais especificamente na microrregião do Baixo Jaguaribe. Além das amostras de medula óssea dos agricultores, foram analisadas 10 amostras de pool medular oriundas de indivíduos saudáveis, da região de Fortaleza, doadores voluntários de medula óssea (Figura 9).

Os agricultores doadores de medula óssea foram estratificados em três grupos, conforme seu modo de produção (RIGOTTO, 2010), e considerando os setores agrícolas da cidade de Limoeiro do Norte:

- ❖ Grupo 1. Grande Produtor (trabalhadores do agronegócio);
- ❖ Grupo 2. Agricultura Familiar (trabalhadores do segmento pequeno produtor);
- ❖ Grupo 3. Agricultura Ecológica (trabalhadores do segmento agroecológica).

#### **3.3. Coleta de Dados**

Foram obtidas informações por meio de um questionário semiestruturado adaptado de Rigotto 2010 (Apêndice A) destinado aos agricultores para avaliação do modelo de vida e trabalho dos trabalhadores rurais. Os dados estavam agrupados nos tópicos conforme se seguem:

1. CARACTERÍSTICAS SOCIOECONÔMICAS – nome, data de nascimento, telefone, endereço, trabalho no cultivo de banana;
2. CARACTERÍSTICA DEMOGRÁFICA – cidade em que mora, tempo em que mora nesta localidade;
3. HÁBITOS DE VIDA – uso de bebida alcoólica, bebida preferida, hábito de fumar, frequência do uso de fumo;
4. HISTÓRIA REGRESSA FAMILIAR – algum componente da família já teve algum tipo de câncer nos últimos dez anos, tipo de câncer que essa pessoa desenvolveu;
5. CARACTERIZAÇÃO DO TRABALHO – anos de trabalho na agricultura, atividade de trabalho antes de trabalhar na agricultura, setor da empresa que trabalha, função que exerce no trabalho;
6. CARACTERIZAÇÃO DA EXPOSIÇÃO DO TRABALHADOR – uso de agrotóxico (s), tipo de contato, atividade (s) de trabalho que tem (têm) contato com agrotóxicos, contato durante pulverização aérea, agrotóxicos que têm contato, tempo de trabalho com agricultura familiar, frequência do contato com agrotóxicos, tempo do último contato com agrotóxicos, contato com agrotóxico durante a agricultura familiar, tempo que trabalhou com estes agrotóxicos;
7. MEDIDAS DE CONTROLE DO RISCO ADOTADOS PELO TRABALHADOR – medidas de prevenção que adota no trabalho (luvas, máscaras, lenço, óculos, chapéu, botas, macacão, observação dos ventos, banho após trabalho, nenhuma proteção), local onde os EPI's são lavados, local onde as roupas que usa no trabalho são lavadas, separação entre roupas do trabalho e roupas da família durante lavagem, destino das embalagens vazias dos produtos químicos usados na empresa;
8. HISTÓRIA CLÍNICA DO TRABALHADOR – presença de algum problema de saúde, uso de algum medicamento.

### **3.4. Coleta das amostras**

A medula óssea, tanto dos agricultores quanto dos doadores voluntários inseridos no grupo controle, foram coletadas em seringa heparinizada, para avaliação do cariótipo por banda G. O procedimento do cariótipo por banda – G teve início à época das coletas (ver seção 3.3).

Além disso, foram coletadas amostra de medula óssea em tubos 15x75 mm com EDTA. Todas as amostras de medula óssea foram coletadas por um médico hematologista experiente, o mesmo foi feito após consentimento informado. As amostras de medula total foram

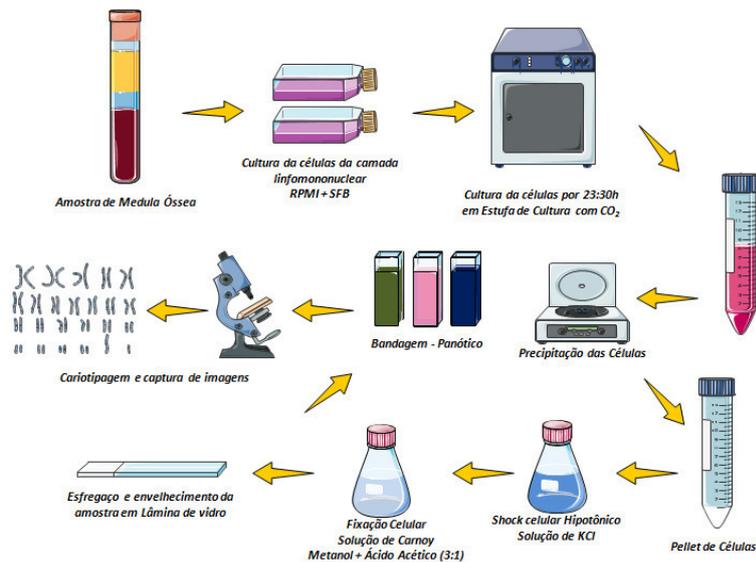
centrifugadas (1811xg por 15 minutos a 4°C) e a camada leucocitária foi transferida para tubos contendo 1mL de Trizol LS (solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina – Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) com 250µL de PBS 1X com DEPC (Dietilpirocarbonato; Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha). Em seguida, as amostras foram homogeneizadas em vórtex por 1 minuto e armazenadas a -80 °C para posterior extração de RNA e DNA (ver seção 3.4.2).

### **3.5. 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 adaptado por Pinheiro (PINHEIRO et al, 2009) (Figura 9). 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 metanol e ácido acético (3:1), por 3 vezes.

Para confecção das lâminas para análise, o material foi gotejado em lâminas de microscopia e secado ao ar. As bandas foram feitas pela técnica de tripsina-Giemsa (GTG), sendo analisadas pelo menos 20 metáfases, sempre que possível, e os cromossomos classificados de acordo com o Sistema Internacional de Nomenclatura Citogenética Humana - ISCN 2014. As metáfases foram capturadas em sistema computadorizado (Cytovision) com software para cariotipagem e o cariótipo foi digitalizado e impresso em impressora a laser.

**Figura 10:** Representação esquemática dos procedimentos da citogenética por banda G.



### 3.6. Análise da Expressão do mRNA por qPCR

#### 3.6.1. Extração de RNA Total

A extração de RNA das células do *pool* medular dos agricultores e dos controles foi realizada a partir da utilização do Trizol LS Reagente® de acordo com o protocolo pelo fabricante. Para cada 10<sup>6</sup> células armazenadas em 1mL de Trizol Reagente® foram adicionados 200µL de Clorofórmio para desproteinização e posterior centrifugação a 11.000 RPM por 15' a 2° C. O RNA total presente na fase aquosa foi transferido para um microtubo estéril de 1,5mL, precipitado com 0,5 mL de isopropanol, e incubado em temperatura ambiente durante 10 minutos.

O RNA total foi, então, recuperado por 10 minutos de centrifugação à 4° C e 12.000g e posteriormente lavado com 1 mL de etanol 75% (v/v) em água deionizada tratada com diethylpirocarbonate (DEPC) 0,1%. Após ser seco, o RNA foi diluído em água DEPC para evitar a sua degradação.

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.

### 3.6.2. Síntese de 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*®). Os procedimentos referentes à síntese do cDNA foram realizados de acordo com as recomendações do fabricante.

Para cada reação de transcrição reversa foram utilizados uma quantidade otimizada de RNA total para uma concentração final de 2000ng. Para cada reação, utilizou-se de 2,0µL de *buffer*, 0,8µL de dNTP, 2,0µL de *Random Primers*, 1,25µL de *Multiscribe Reverse Transcriptase*<sup>TM</sup> e 1,0µL de *RNAse Inhibitor*.

A quantidade citada de cada reagente foi multiplicada pelo número de amostras de RNA total para a confecção de um “Mix” de reação. Posteriormente, 6,8µL deste Mix foi adicionado a cada microtubo de PCR de 0,2 mL. Em seguida foram adicionados as quantidades otimizadas de RNA total para cada amostra nos microtubos devidamente identificados em um volume final de 3,2µL. Por fim, o volume final de 10µL de cada reação foram submetidos ao termociclador onde foram realizados os seguintes ciclos de termociclagem para a síntese de cDNA: 25°C por 10 minutos e 37°C por 120 minutos.

Por fim, as amostras de cDNA foram armazenadas em um freezer a uma temperatura de -20°C.

### 3.6.3. qPCR (PCR quantitativo em tempo real)

A quantificação da expressão gênica dos cinco genes avaliados neste estudo (Tabela 2) foi realizada a partir da análise da técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) realizadas no aparelho *7500 Real-Time PCR System*® (*Applied Biosystems, Inc.*, Foster City, CA, USA) disponível no Laboratório de Citogenômica do Câncer da Universidade Federal do Ceará sob orientação do professor Ronald Feitosa Pinheiro e a professora Maria Meira Silvia Magalhães. As reações foram preparadas utilizando-se do *TaqMan*® *Universal PCR Master Mix* (*Applied Biosystems, Inc.*, Foster City, CA, USA) otimizado para reações com sonda *TaqMan assay*® (Tabela 2) e contendo a *AmpliTaq Gold* DNA polimerase, os dNTPs e tampão otimizados.

**Tabela 2:** Genes avaliados por qPCR envolvidos nos mecanismos de reparo em danos de fita simples do DNA.

GeneBank	Símbolo	Nomenclatura	Mecanismo de reparo	TaqMan Assay
NC_000005.10	<i>ERCC8/CSA</i>	Excision repair cross-complementation group 8	Complexo de ligação Ubiquitina ligase –CSA (transcription coupled repair, TC-NER)	Hs0112212 4_m1
NC_000010.11	<i>ERCC6/CSB</i>	Excision repair cross-complementation group 6	Fator de remodelação da cromatina (transcription coupled repair, TC-NER)	Hs0097292 0_m1
NC_000013	<i>ERCC5/XPG</i>	Excision repair 5	Endonuclease	Hs0155703 1_m1
NC_000009.12	<i>XPA</i>	Xeroderma pigmentosum, complementation group A	Reparo por NER	Hs0016604 5_m1
NC_000003.12	<i>XPC</i>	Xeroderma pigmentosum, complementation group C	Reparo por NER (global genomic repair, GG-NER)	Hs0089785 4_m1
NC_000023.11	<i>HPRT1</i>	Hypoxanthine phosphoribosyltransferas e 1	Gene Endógeno	Hs0280069 5ml
NM_021009.5	<i>UBC</i>	Ubiquitin C	Gene Endógeno	Hs0082472 3_m1

Os preparos e armazenamentos dos materiais foram realizados de acordo com as instruções do fabricante, excetuando o volume final de cada reação otimizado em 10  $\mu$ L. Para cada reação foram utilizados 5,0 $\mu$ L de TaqMan PCR Master Mix, 0,5  $\mu$ L de sonda *TaqMan assay*<sup>®</sup> e 2,5 $\mu$ L de cDNA (diluído 1:5). Após esta etapa, as placas das reações foram centrifugadas por 1 minuto a 4500 rpm.

As condições para a reação de PCR foram as seguintes: pré-aquecimento a 50° C por 2 minutos, ativação da polimerase a 95° C por 10 minutos e 40 ciclos de desnaturação (15 segundos a 95° C) e anelamento e extensão (60 segundos a 60°C). Na preparação das reações foram utilizadas placas de polipropileno para 96 reações (*MicroAmp 96-well Plates, Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, USA*) cobertas com adesivos para microplacas ópticas resistentes a álcool e a altas temperaturas (*Optical Adhesive film, Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, USA*). Todas as etapas do procedimento descrito foram realizadas com as amostras imersas em gelo com pouca exposição à luz.

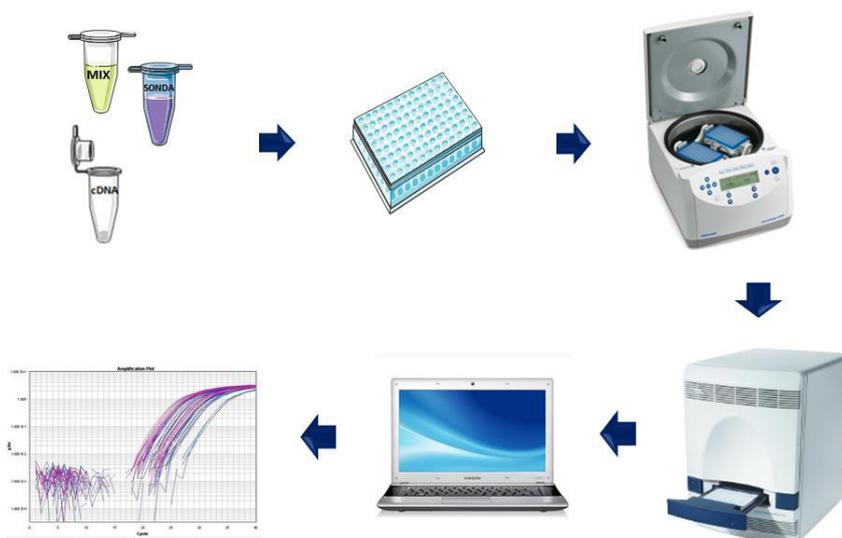
Cada amostra foi avaliada em duplicata e foram consideradas para análise somente as amostras cujas diferenças de amplificação não excedeu a 0,8 ciclos ( $\Delta Cq \leq 0,8$ ) (VANDESOMPELE et al., 2002). As duplicatas das amostras que apresentaram diferenças

maiores que um ciclo e meio, mesmo após repetição do experimento, foram desconsideradas. Em todas as placas foram realizados controles negativos (NTC) das reações para todos os genes estudados sendo que, para estas reações, foram adicionados 2,5 $\mu$ L de água ao invés de cDNA. Todas as reações que mostraram amplificação para qualquer um dos controles negativos foram desconsideradas.

Adicionalmente, foi utilizado para cada placa e por cada gene estudado, uma amostra de referência (REF), em duplicata, a fim de padronizar e validar todas as placas do experimento. A amostra referência foi composta por cDNA oriundo de mRNA de um *pool* de duas linhagens celulares oriundas de tumores humanos disponibilizada pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - FMRP/USP.

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 a realização das análises estatísticas. Ao final de cada corrida os dados foram exportados para planilhas do software Excel para o cálculo dos valores de  $\Delta Cq$  e de  $2^{-\Delta Cq}$  tanto dos genes alvos quanto dos genes endógenos (LIVAK et al, 2001). A representação esquemática da metodologia de qPCR se encontra na figura 11. 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).

**Figura 11:** Representação esquemática dos procedimentos de qPCR.



### **3.6.4. Validação e definição dos genes endógenos utilizados nas análises dos dados de qPCR.**

Tendo em vista a necessidade de validar a estabilidade do nível de expressão de genes candidatos a controles endógenos para os experimentos de qPCR realizados no presente estudo (PFAFFL, 2001; LIVAK, 2001), foi utilizado o software *Best keeper* (PFAFFL, 2004) correspondendo a uma ferramenta que permite a identificação estatística dos genes endógenos mais estáveis de um grupo de candidatos a normalizadores para um dado experimento. Com este aplicativo em Excel, pode-se calcular o desvio padrão de cada amostra para cada gene endógeno avaliado com base em valores brutos de  $C_q$ , independentemente da eficiência da amostra (PFAFFL, 2004). As amostras de cada gene com o menor SD é considerada a mais estável.

Iniciamos este estudo com a utilização de três endógenos, mantendo-se no final apenas os dois melhores, no qual foi considerado a Ubiquitina e o HPRT1. Estabelecidos com um SD menor que um.

### **3.6.5. Validação da qualidade, integridade e estabilidade do nível de expressão das amostras de cDNA dos agricultores avaliados.**

Sabe-se que a ocorrência de dados classificados como *outliers*, frente às amostras avaliadas em um dado estudo, pode interferir na precisão da estimativa correta das análises realizadas. Assim, antes de qualquer avaliação dos dados para realização de análises estatísticas, a fim de determinar a qualidade, integridade e estabilidade do nível de expressão das amostras dos pacientes avaliados, utilizou-se também o software *Best Keeper* para retirada dos *outliers* e conseqüente manutenção das amostras mais estáveis para este estudo (PFAFFL, 2004).

### **3.7. Variáveis analisadas**

As variáveis avaliadas neste estudo, utilizadas nas análises de associações estatísticas, foram baseadas no conjunto de perguntas advindas do questionário semiestruturado adaptado de Rigotto 2010 (Apêndice A) e estão subdivididas da seguinte forma:

- Uso de agrotóxicos (agricultores do grupo grande produtor e agricultura familiar) e não uso de agrotóxicos (agricultores do grupo agricultura ecológica);
- Grupos dos agricultores (Grande produtor, agricultura familiar e agricultura ecológica);

- Grupo dos agricultores e grupo controle;
- Consumo de bebida alcoólica dentre os agricultores expostos a pesticidas;
- Tipos de bebida consumido;
- Hábito tabagista dentre os agricultores expostos a pesticidas;
- Frequência do uso de tabaco durante o dia;
- Presença de caso de câncer familiar nos últimos dez anos;
- Cariótipo normal e cariótipo alterado dos agricultores;
- Tempo de trabalho na agricultura;
- Tempo de trabalho na agricultura familiar;
- Tempo de uso de agrotóxico no trabalho;
- Tempo do último contato com agrotóxicos;
- Tipo de contato com agrotóxico;
- Frequência do contato com agrotóxico;
- Frequência do uso de EPI's (luvas, máscara, óculos, botas, macacão);
- Lavagem dos EPI's.

### 3.8. Análise estatística

#### 3.8.1. Análises estatísticas para a avaliação dos dados de expressão gênica

Os resultados referentes às análises do nível de expressão gênica foram analisados com base no valor de cada  $Cq$  (quantitative cycle), para cada amostra de cDNA (em duplicata). 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 constitutivos utilizados (*HPRT-1* e *Ubiquitin*) da mesma amostra, gerando assim os valores de  $\Delta Cq$  e, conseqüentemente, de  $2^{-\Delta Cq}$  (LIVAK et al, 2001; SCHMITTGEN; LIVAK, 2008).

O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para verificar se os dados de cada variável analisada se apresentavam com distribuição normal (dados paramétricos, com grupos com menos de 50 casos). Os valores de *outliers* foram retirados (quando ocorreram), por não representarem os resultados que 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, para a comparação das médias em variáveis com mais de dois grupos. O pós-teste (*post-hoc*) para a ANOVA foi

definido a partir da análise da homogeneidade de variâncias através do teste de Levene. Caso houvesse homogeneidade de variâncias ( $p\text{-valor} \geq 0,05$ ), foi definido como pós-teste para a ANOVA o teste de Tukey. Caso não houvesse homogeneidade de variâncias entre os dados ( $p\text{-valor} < 0,05$ ), foi definido como pós-teste para a ANOVA o teste de Games-Howell.

O teste de correlação de *Pearson* foi utilizado para a obtenção dos valores de  $r$  e  $r\text{-square}$  ( $r^2$ ) que demonstra 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.

Os dados sobre o nível de expressão gênica (valores de  $2^{-\Delta Cq}$ ) 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).

A representação esquemática da metodologia utilizada neste estudo encontra-se demonstrada na figura 12.

**Figura 12.** Organograma resumo das metodologias utilizadas neste estudo.



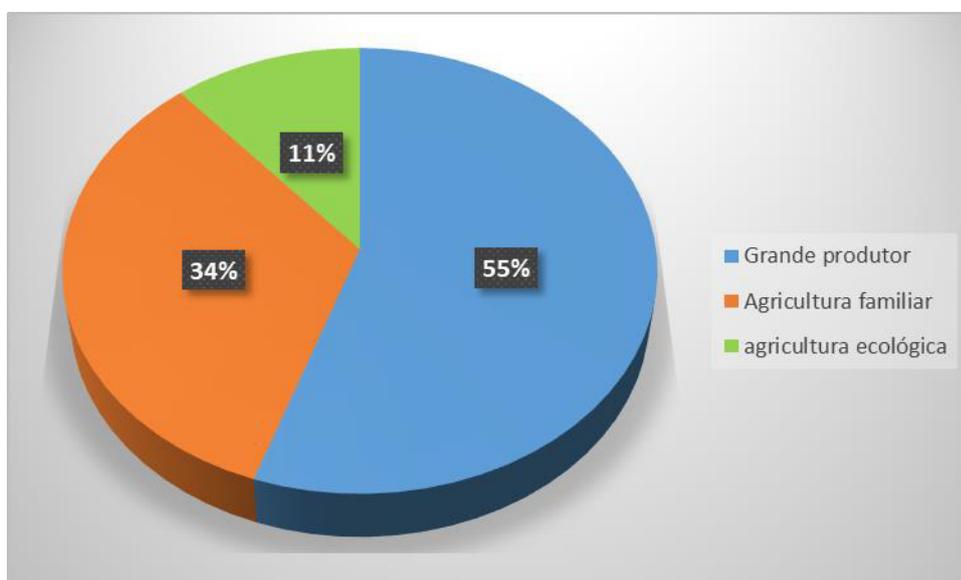
## 4. RESULTADOS

### 4.1. Caracterização dos agricultores

Foram inclusos neste estudo 90 agricultores da região de Limoeiro do Norte/CE e 10 indivíduos voluntários (que não exerciam a atividade nem moravam próximo à área agrícola) para o grupo controle (Figura 13.) Os agricultores foram estratificados em três grupos segundo o modo de produção. O grupo grande produtor (trabalhadores do agronegócio) representam 50/90 (55%) do número geral de trabalhadores, 30/90 (34%) representam o grupo agricultura familiar (trabalhadores do segmento pequeno produtor) e 10/90 (11%) o grupo agricultura ecológica (trabalhadores do segmento agroecológico) (Figura 13).

Diante das variáveis de caracterização dos agricultores, observou-se que foram incluídos apenas 2 indivíduos (2,2%) do sexo feminino e 88 (97,8%) do sexo masculino. Os agricultores apresentaram média de idade de 45 anos, com idade mínima de 22 anos e máxima de 69 anos.

**Figura 13.** Distribuição dos grupos de produção dos agricultores e do controle avaliados nesse estudo.



A média de idade dos agricultores do agronegócio (grande produtor) foi de 41 anos, do pequeno produtor (agricultura familiar) de 50 anos e da agroecologia (agricultura ecológica) de 46 anos (Tabela 3). O grupo do agronegócio apresenta 48(96%) indivíduos do sexo masculinos e 2(4%) do sexo feminino. Enquanto que o grupo do pequeno produtor e

agroecológico estão representados 100% (30/10) por indivíduos do sexo masculino (Tabela 3).

A maioria dos trabalhadores foram expostos a agrotóxicos por mais de 12 anos, seja trabalhando no preparo, na mistura ou na pulverização de pesticidas. No grupo grande produtor, 35 agricultores foram expostos por mais de 12 anos e 12 agricultores foram expostos por 12 anos ou menos (Tabela 3). No grupo do pequeno produtor, 26 trabalhadores foram expostos por mais de 12 anos, enquanto que apenas 2 sofreram exposição por menor tempo (Tabela 3).

Em relação aos hábitos de vida, avaliamos tabagismo e consumo de álcool. Observamos que 27 (58%) dos trabalhadores do agronegócio tinham o hábito de beber e no grupo do pequeno produtor, 15 (53,5%) faziam uso de álcool (Tabela 3). Considerando os dois grupos expostos, 12 agricultores bebiam, no mínimo, uma vez por semana com prevalência para cerveja seguido de bebida destilada (Tabela 2). O grupo não exposto (agroecologia), está representado por 7 (70%) trabalhadores que consomem bebida alcoólica, apenas um com o hábito de beber diariamente e prevalência de bebida destilada (Tabela 1, 2).

Quanto ao hábito de fumar, o grupo do agronegócio está representado por 12 (26%) agricultores fumantes e o grupo pequeno produtor por 2 (7,5%) (Tabela 1). Dentre os 12 do agronegócio, 7 fumam diariamente e os 2 do pequeno produtor também, somando dentre os expostos um número de 9 agricultores com hábito de fumar diariamente (Tabela 4). O grupo não exposto à agrotóxicos está representado por 2 (20%) agricultores que são fumantes e o fazem diariamente (Tabela 3, 4).

O histórico de câncer na família dos trabalhadores é algo presente em 14 (37%) agricultores do grupo grande produtor e 13 (54%) da agricultura familiar (Tabela 3). No que tange ao grupo da agricultura ecológica, correspondem a 6 (60%) o número de trabalhadores com histórico de câncer (Tabela 3).

**Tabela 3.** Características dos trabalhadores rurais dos três grupos avaliados no estudo

Variáveis	Grande produtor	Agricultura familiar	Agricultura ecológica
<b>Média da Idade (mínimo - máximo)</b>	41 (22 - 62)	50 (32 - 69)	46 (32 - 60)
<b>Gênero (%)</b>			
feminino	2 (4)	0 (0)	0 (0)
masculino	48 (96)	30 (100)	10 (100)
<b>Tempo de exposição (%)</b>			
< 12 anos	12 (25,5)	2 (7)	
≥ 12 anos	35 (74,5)	26 (93)	
<b>Fumantes (%)</b>			
sim	12 (26)	2 (7,5)	2 (20)
não	35 (74)	25 (92,5)	8 (80)
<b>Etilistas (%)</b>			
sim	27 (58)	15 (53,5)	7 (70)
não	20 (42)	13 (46,5)	3 (30)
<b>Histórico de câncer (%)</b>			
sim	14 (37)	13 (54)	6 (60)
não	24 (63)	11 (46)	4 (40)

**Tabela 4.** Frequência do fumo, frequência do consumo de bebida alcoólica e principais tipos de bebidas consumidas dos grupos expostos a agrotóxicos (grande produtor e agricultura familiar) e grupo não exposto (agricultura ecológica).

	Grande produtor	Agricultura familiar	Expostos	Agricultura ecológica (não expostos)
<b>Frequência do consumo de bebida alcoólica (%)</b>				
Diariamente	1 (3,7)	0	1 (2,3)	0
Semanalmente	6 (22,3)	5 (33,3)	11 (26)	1 (14,2)
Esporadicamente*	20 (74)	10 (66,6)	30 (71,7)	9 (85,8)
<b>Tipo de bebida mais consumida (%)</b>				
Bebida destilada	16 (59)	8 (53)	24 (57)	5 (71)
Cerveja	19 (70)	7 (46,5)	26 (62)	4 (57)
Outras**	3 (11)	2 (13)	5 (12)	1 (14)
<b>Frequência do hábito de fumar (%)</b>				
Diariamente	7 (58)	2 (100)	9 (64)	2 (100)
Raramente	5 (42)	0	5 (36)	0

\*bebe mensalmente ou raramente

\*\*vinho, conhaque, rum e vodca

A maioria dos trabalhadores apresentaram mais de 12 anos de trabalho com agricultura e conseqüente exposição a agrotóxicos. Na tabela 5 está estratificado os anos, no qual 2 (2,5%) agricultores apresentaram menos de 1 ano, 8 (10%) mostraram de 1 a 4 anos, 3 (4%) de 5 a 8 anos, 2 (2,5%) de 8 a 12 anos e 61 (76%) mais de 12 anos de trabalho e exposição a substâncias químicas na agricultura.

Dentre os agricultores dos grupos do agronegócio e do pequeno produtor, afirmaram ter contato com agrotóxico 65 (81%) deles (Tabela 5). Destes, 36 (55,5%) demonstraram ter contato direto com o agrotóxico, ou seja, tinham contato durante a atividade de trabalho; e 27 (41,5%) revelaram ter contato indireto, que se daria após aplicação, durante a colheita, muda e outros; e 2 (3%) relataram ter contato durante pulverização aérea (Tabela 5).

Em relação as atividades exercidas no trabalho tiveram maior representatividade aquelas que eram em área pulverizada, expresso por 29 (36%) dos trabalhadores. Em seguida a atividade de pulverização costal, exercida por 20 (25%) agricultores, seguida da atividade de preparação de misturas, representado por 11 (14%) agricultores e atividade de armazenamento, exercida por 7 (9%) dos trabalhadores (Tabela 5). Outras atividades foram referidas por 21 (26%) dos agricultores (Tabela 5). Ressalta-se que alguns trabalhadores exerciam mais de um tipo de atividade.

**Tabela 5.** Caracterização do trabalho e da exposição do trabalhador dos agricultores expostos a pesticidas (grande produtor e agricultura familiar).

	Nº	%
<b>Tempo de exposição estratificado</b>		
menos de 1 ano	2	2,5
de 1 - 4 anos	8	10
de 5 - 8 anos	3	4
de 8 - 12 anos	2	2,5
mais de 12 anos	61	76
<b>Contato com agrotóxico</b>		
sim	65	81
não	3	4
<b>Tipo de contato</b>		
direto	36	55,5
indireto	27	41,5
durante pulverização aérea	2	3
<b>Atividades exercidas na agricultura</b>		
trabalho em área pulverizada	29	36
pulverização costal	20	25
preparação de misturas	11	14
armazenamento	7	9
outras*	21	26

\*Descarte de embalagem, limpeza de roupa, limpeza de equipamento, transporte, embalagem do produto final.

Quanto ao uso de equipamento individual (EPI) apenas 8 (10%) agricultores demonstraram ter o cuidado de utilizar toda a proteção recomendada (luvas, máscaras, óculos, macacão, botas) durante o preparo e aplicação de produtos químicos. Dentre os demais, 5 (6,25%) trabalhadores não usavam nenhum equipamento para proteção e o restante utilizavam frequentemente ou de forma esporádica apenas alguns EPI's (Tabela 6).

Quanto a lavagem de EPI's foi identificado que 42 (52%) dos trabalhadores faziam a lavagem em casa e 28 (35%) faziam na empresa; e enquanto a lavagem das roupas de uso no trabalho, 63 (79%) afirmaram lavar em casa e 28 (35%) afirmaram lavar na empresa (Tabela 6). Ademais, em relação à lavagem em casa, 43 (68%) demonstraram lavar as roupas do trabalho separado das roupas da família e 21 (33%) não apresentavam este cuidado (Tabela 6)

**Tabela 6.** Medidas de controle e do risco adotadas pelo trabalhador.

	Nº	%
<b>Luvas</b>		
frequentemente	44	55
às vezes	8	10
nunca	20	25
<b>Máscara</b>		
frequentemente	25	31
às vezes	10	12,5
nunca	32	40
<b>Óculos</b>		
frequentemente	19	24
às vezes	6	7,5
nunca	39	49
<b>Macacão</b>		
frequentemente	26	32,5
às vezes	1	1,2
nunca	36	45
<b>Botas</b>		
frequentemente	66	82,5
às vezes	2	2,5
nunca	5	6
<b>Lavagem de EPI's</b>		
em casa	42	52,5
na empresa	28	35
<b>Lavagem das roupas</b>		
em casa	63	79
na empresa	9	11
<b>Lavagem das roupas de trabalho separadas das roupas da família</b>		
sim	43	68
não	21	33

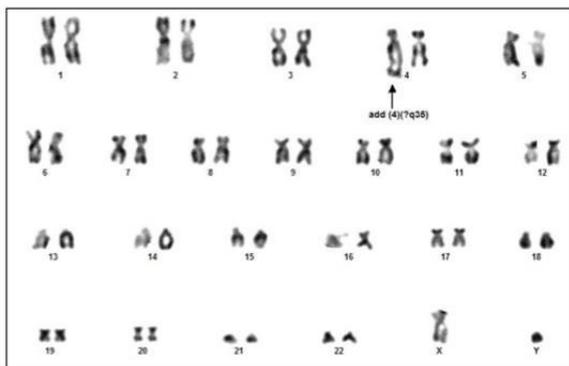
Alguns agricultores desconheciam o tipo ou o nome do agrotóxico (mais utilizados), mas dentre aqueles que responderam, foi possível identificar os pesticidas mais usados. A lista está enumerada na tabela 7.

**Tabela 7.** Lista dos pesticidas mais citados pelos trabalhadores rurais.

Ordem	Agrotóxicos mais citados	Nome comum (composição)	%
1º	Roundup®	Glifosato	16,25
2º	Gramoxone 200	Paraquat	11,25
3º	Folicur 200 ce	Tebuconazole	7,5
4º	Tecto® sc	Thiabendazole	6,25
5º	Orius 250 ec	Tebuconazole	5

#### 4.2. Citogenética Clássica

Após cultura de células hematopoiéticas e todo procedimento para análise citogenética foi feito a avaliação cromossômica de 40 casos. Corresponderam a 28 casos que revelaram ausência de anormalidades com cariótipo normal e 12 casos que foram detectadas alterações cromossômicas (Tabela 8). O restante dos casos não houve crescimento celular suficiente com consequente ausência de metáfases para avaliação do número e estrutura dos cromossomos. A figura 14 apresenta dois casos com resultados alterados.

**Figura 14.** Cariótipos de dois casos alterados avaliados nesse estudo.**Caso 29: revela material adicional no cromossomo 4.****Caso 43 revela deleção do braço longo do cromossomo 11.**

**Tabela 8.** Casos com resultado avaliados na citogenética clássica.

<b>Caso</b>	<b>Idade</b>	<b>Resultado citogenética</b>	<b>Resultado final</b>
1	25	46,XY[20]	Normal
2	34	46,XY[15]	Normal
3	29	46,XY[20]	Normal
4	33	46,XY[11]	Normal
5	31	46,XY[20]	Normal
6	52	46,XY[30]	Normal
7	53	46,XY,add(4)	Alterado
8	48	46,XY[7]	Normal
9	25	46,XY[6]	Normal
10	49	Hipodiploide - 44,XY,-20,-21[8]46,XY[2]	Alterado
11	43	46,XY[15]	Normal
12	43	46,XY[20](de11)	Alterado
13	25	46,XY[20]	Normal
14	34	46,XY,add(4)/46,XY[15]	Alterado
15	28	46,XY[10]	Normal
16	51	46, XY [10]	Normal
17	62	Hipodiploide	Alterado
18	41	46,XX,del(18)(p11.21)[4]/46,XX[22]	Alterado
19	36	46,XY[10]	Normal
20	64	46,XY[5]	Normal
21	60	46,XY(de11)	Alterado
22	27	46,XY[20]	Normal
23	50	46,XY[10]	Normal
24	49	46,XY[20]	Normal
25	45	46,XY[10]	Normal
26	53	47, XY mar (4)	Alterado
27	42	Hipodiploide	Alterado
28	54	46,XY[7]	Normal
29	34	46,XY[20]	Normal
30	57	46,XY[20]	Normal
31	60	46,XY[25]	Normal
32	43	46,XY(de15)	Alterado
33	32	46,XY[15]	Normal
34	59	46, XY [4]	Normal
35	53	46,XY[20]	Normal
36	56	46,XY[17]	Normal
37	40	46,XY[7]	Normal
38	54	Hiperdiploide	Alterado
39	52	46,XY[18]	Normal
40	46	Hipodiploide	Alterado

**Legenda:** Del. Deleção. Add. Adicional. Mar. Marcador.

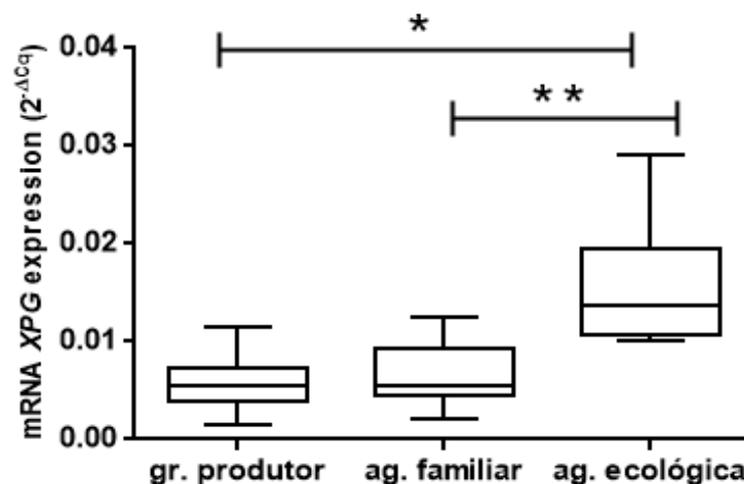
### 4.3. Análise da expressão dos genes de reparo de fita simples do DNA

Os níveis de expressão gênica referente aos genes *XPG*, *XPC*, *XPA*, *CSB* e *CSA* frente as variáveis avaliadas nesse estudo serão apresentadas nas seções a seguir.

#### 4.3.1. Análise do nível de expressão do gene *XPG*

Para o gene *XPG*, identificou-se associações significantes entre os três grupos de produção em que se encaixam os agricultores avaliados nesse estudo, grande produtor, agricultura familiar e agricultura ecológica. Observou-se que o nível de expressão do gene *XPG* apresenta-se menor nos agricultores do grupo grande produtor ( $p=0,008$ ) e no grupo agricultura familiar ( $p=0,012$ ) quanto ao grupo da agricultura ecológica (Figura 15).

**Figura 15.** Nível de expressão do gene *XPG* frente aos grupos de produção em que estão inseridos os agricultores rurais.

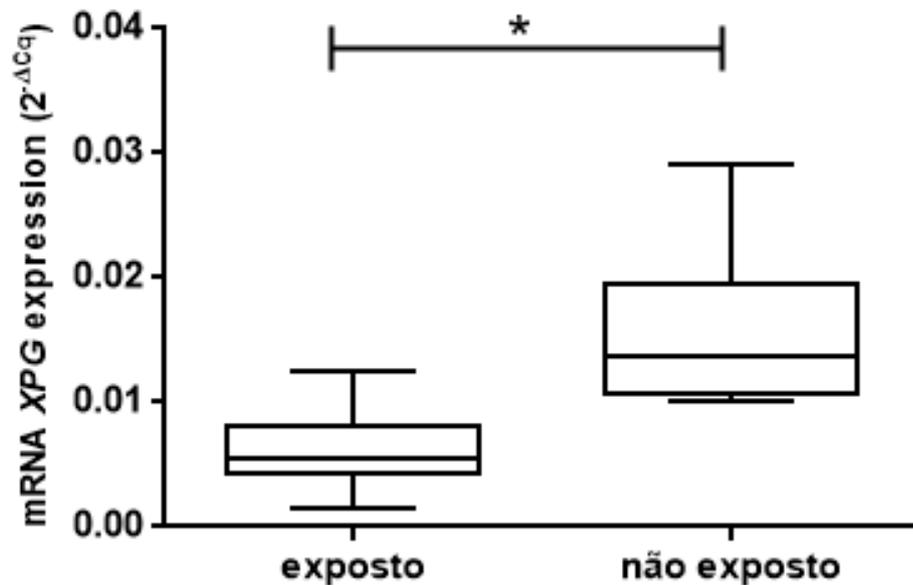


		Nível de Expressão ( $\Delta Cq$ )								
		N	%	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	ANO VA†	Teste de Levene	Games-Howell pos-hoc test
Grupos de produção dos agricultores	Grande produtor	39		0,0057843	0,002504	0,001598	0,114929	0,000	0,002	*0,008
	Agricultura Familiar	23		0,0065408	0,003048	0,001598	0,114929			**0,012
	Agricultura Ecológica	9		0,0117957	0,001875	0,010001	0,145387			*0,008 **0,012

†ANOVA one-way. Teste de Levene - Teste de homogeneidade de variâncias.  
Valor estatisticamente significante para  $p \leq 0,05$ .

Ao juntar os grupos grande produtor e agricultura familiar e analisá-los como único grupo e considerando-o como grupo exposto a agrotóxicos, observou-se que o nível de expressão do gene *XPG* mostrou-se baixo expresso quando comparado com o grupo não exposto (grupo da agricultura ecológica) ( $p=0,004$ ) (Figura 16).

**Figura 16.** Nível de expressão do gene *XPG* para o grupo exposto (grande produtor e agricultura familiar) e grupo não exposto (agricultura ecológica).

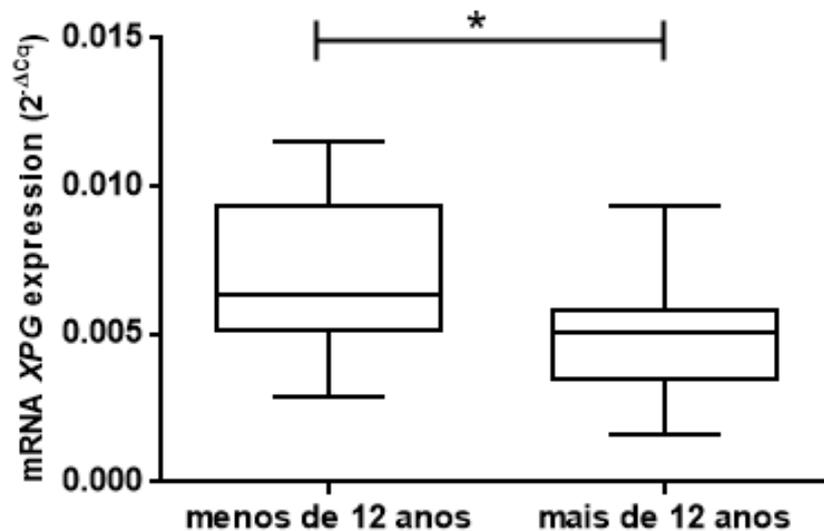


		Nível de Expressão ( $\Delta Cq$ )						Teste de Levene	p-valor <sup>‡</sup>
		N	%	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo		
Exposição a agrotóxicos	Expostos	58	87,8	0,0060451	0,002701	0,0015982	0,0124895	0,001	*0,004
	Não expostos	8	12,2	0,0156476	0,006498	0,0100012	0,0291698		

<sup>‡</sup>Teste *t de Student*. Teste de Levene - Teste de homogeneidade de variâncias.  
Valor estatisticamente significativo para  $p \leq 0,05$ .

Em relação ao tempo de exposição, em que se enquadram os trabalhadores dos grupos grande produtor e agricultura familiar, avaliou-se agricultores com exposição menor que 12 anos e exposição igual ou maior a 12 anos. O gene *XPG* mostrou-se baixo expresso no segundo grupo, com exposição igual ou superior a 12 anos ( $p=0,010$ ) (Figura 17).

**Figura 17.** Nível de expressão do gene *XPG* dos agricultores frente ao tempo de trabalho com exposição a agrotóxicos.

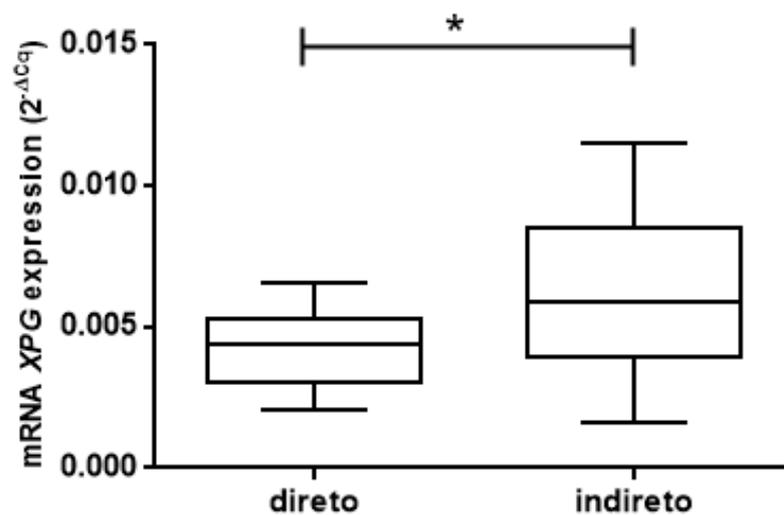


		Nível de Expressão ( $\Delta Cq$ )							
		N	%	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	Teste de Levene	p-valor†
Tempo de exposição a agrotóxicos	Menos de 12 anos	12	25	0,0069444	0,002655	0,0028718	0,011492	0,155	*0,010
	Mais de 12 anos	36	75	0,0050048	0,001988	0,0015982	0,124895		

†Teste *t de Student*. Teste de Levene - Teste de homogeneidade de variâncias.  
Valor estatisticamente significativo para  $p \leq 0,05$ .

Quanto a variável tipo de contato, foi avaliado a expressão do gene *XPG* em agricultores que tinham contato direto com o agrotóxico e aqueles que tinham contato indireto. Assim, demonstrou-se que trabalhadores expostos a agrotóxicos e que apresentavam contato direto mostraram nível de expressão do gene *XPG* menor do que os agricultores que sofriam contato indireto ( $p=0,008$ ) (Figura 18).

**Figura 18.** Nível de expressão do gene *XPG* quanto ao tipo de contato com agrotóxicos.



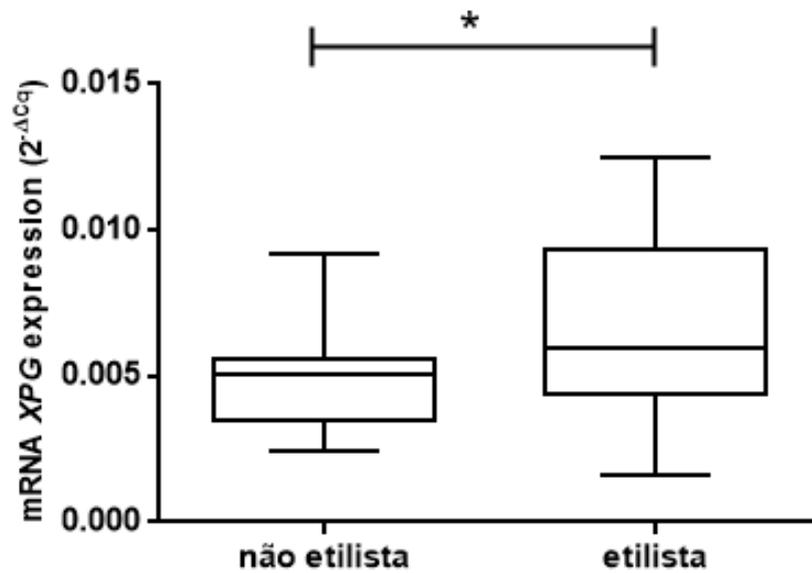
		Nível de Expressão ( $\Delta Cq$ )						Teste de Levene	p-valor <sup>‡</sup>
		N	%	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo		
Tipo de contato	Direto	21	51	0,0043721	0,001284	0,0020547	0,0065757	0,002	*0,008
	Indireto	20	49	0,0063148	0,002780	0,0015982	0,0114929		

<sup>‡</sup>Teste *t de Student*. Teste de Levene - Teste de homogeneidade de variâncias.

Valor estatisticamente significativo para  $p \leq 0,05$ .

Ao avaliar alguns hábitos de vida dos agricultores, como consumo de bebida alcoólica e tabagismo, foram obtidas importantes associações. Quanto ao etilismo, observou-se, dentre os agricultores expostos a pesticidas, que o gene *XPG* apresenta menor expressão em relação aos que não consomem bebida alcoólica ( $p=0,009$ ) (Figura 19).

**Figura 19.** Nível de expressão do gene *XPG* frente ao consumo de bebida alcoólica.



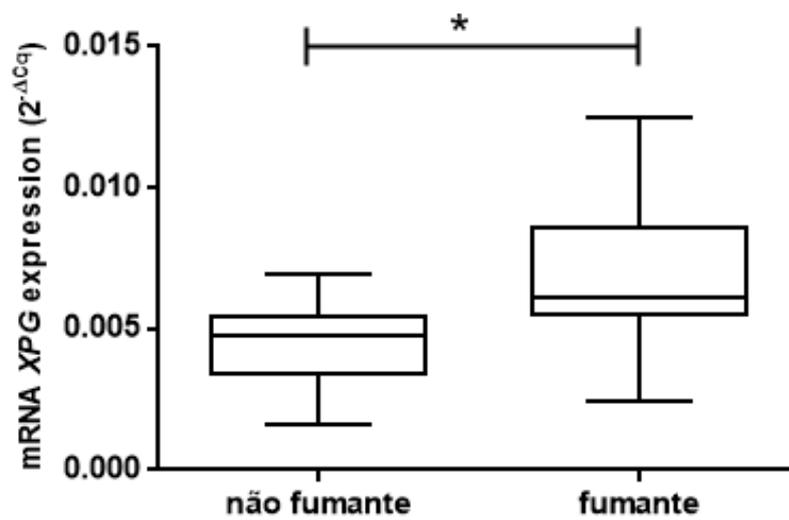
		Nível de Expressão ( $\Delta Cq$ )						Teste de Levene	p-valor <sup>‡</sup>
		N	%	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo		
Consumo de bebida alcoólica	Não etilista	22	42	0,0048693	0,001665	0,0016654	0,0092105	<b>0,001</b>	<b>*0,009</b>
	Etilista	30	58	0,0006501	0,003005	0,0015982	0,0124895		

<sup>‡</sup>Teste *t* de Student. Teste de Levene - Teste de homogeneidade de variâncias.

Valor estatisticamente significativo para  $p \leq 0,05$ .

Assim como o hábito de consumir bebida alcoólica, o tabagismo, dentre os agricultores expostos a pesticidas, mostrou para o gene XPG um nível de expressão mais baixo para os não fumantes em relação aos agricultores que possuem o hábito de fumar ( $p= 0,010$ ) (Figura 20).

**Figura 20.** Nível de expressão do gene XPG em relação ao hábito de fumar.



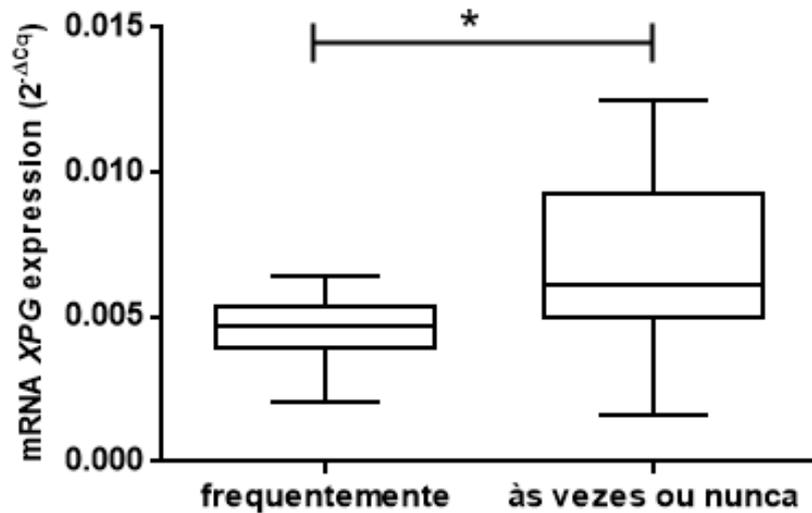
		Nível de Expressão ( $\Delta Cq$ )							
		N	%	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	Teste de Levene	P-valor <sup>‡</sup>
Tabagismo	Não fumante	30	69,7	0,00445272	0,0013474	0,0015982	0,0069213	0,007	*0,010
	Fumante	13	30,2	0,00695820	0,0028996	0,0024168	0,124895		

<sup>‡</sup>Teste *t de Student*. Teste de Levene - Teste de homogeneidade de variâncias.

Valor estatisticamente significante para  $p \leq 0,05$ .

Em relação ao uso de equipamentos de proteção individual (EPI's) avaliou-se a expressão do gene *XPG* referente ao uso de máscara, luvas, óculos, macacão e botas. No entanto, obtiveram-se resultados de associação significativos somente para os equipamentos máscara e macacão. Avaliou-se o uso de EPI's em relação a frequência de uso, e tratando do uso de máscara, a expressão do nível de *XPG* mostrou-se menor para aqueles que frequentemente usavam o equipamento ( $p= 0,000$ ) (Figura 21).

**Figura 21.** Nível de expressão do gene *XPG* frente a frequência do uso de máscara.



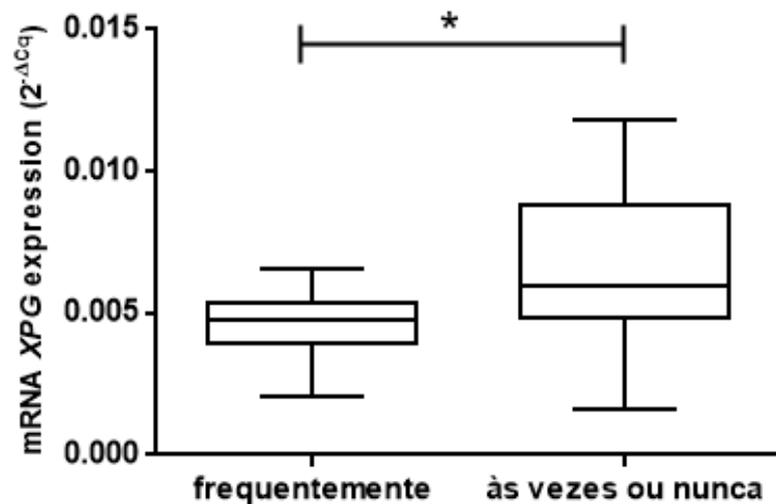
		Nível de Expressão ( $\Delta Cq$ )							
		N	%	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	Teste de Levene	p-valor <sup>‡</sup>
Uso de EPI - máscara	Frequentemente	16	34	0,0045171	0,001146	0,0020547	0,0064177	0,001	*0,000
	Às vezes ou nunca	31	66	0,0068198	0,002793	0,0015982	0,0124895		

<sup>‡</sup>Teste *t de Student*. Teste de Levene - Teste de homogeneidade de variâncias.

Valor estatisticamente significativo para  $p \leq 0,05$ .

Quanto ao macacão, observou-se que o perfil de expressão do gene *XPG*, assim como para a máscara, mostrou-se menor expresso para o uso frequentemente do equipamento ( $p=0,003$ ) (Figura 22).

**Figura 22.** Nível de expressão do gene *XPG* quanto a frequência do uso de macacão.



		Nível de Expressão ( $\Delta Cq$ )							
		N	%	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	Teste de Levene	p-valor†
Uso de EPI - macacão	Frequentemente	16	38,1	0,0045274	0,001163	0,0020547	0,0065757	<b>0,003</b>	<b>*0,003</b>
	Às vezes ou nunca	26	61,9	0,0064607	0,002684	0,0015592	0,0118108		

†Teste *t de Student*. Teste de Levene - Teste de homogeneidade de variâncias.

Valor estatisticamente significativo para  $p \leq 0,05$ .

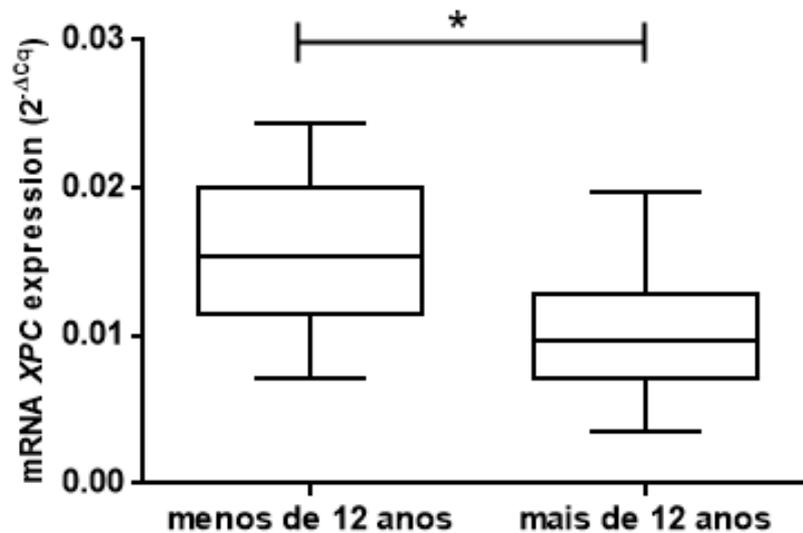
Não foram identificadas associações significantes deste gene para as variáveis cariótipo alterado e normal, presença de histórico de câncer na família, uso de EPI's (luvas, botas e óculos) e lavagem de EPI's em casa ou no trabalho. Os mesmos apresentaram p-valores superiores a 0,05.

### 4.3.2. Análise do nível de expressão do gene *XPC*

Frente às análises do gene *XPC*, verificaram-se importantes associações do nível de expressão deste gene com às variáveis relacionadas ao tempo de exposição, consumo de álcool, tabagismo e uso de EPI.

Quanto ao tempo de exposição aos agrotóxicos, verificou-se que trabalhadores expostos a mais de 12 anos apresentam menor nível de expressão do gene *XPC* em relação a agricultores com tempo inferior a 12 anos de trabalho com agroquímicos ( $p= 0,001$ ) (Figura 23).

**Figura 23.** Nível de expressão do gene *XPC* em relação ao tempo de exposição aos agrotóxicos.



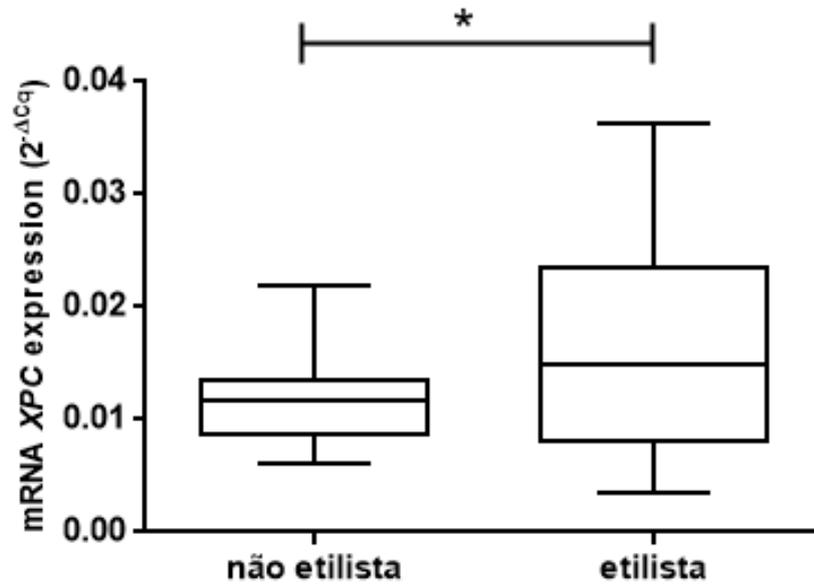
		Nível de Expressão ( $\Delta Cq$ )							
		N	%	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	Teste de Levene	p-valor†
Tempo de exposição a agrotóxicos	Menos de 12 anos	12	27,3	0,1586360	0,005359	0,0071432	0,0196659	0,336	*0,001
	Mais de 12 anos	32	72,7	0,0105749	0,004264	0,0034934	0,0356410		

†Teste *t de Student*. Teste de Levene - Teste de homogeneidade de variâncias.

Valor estatisticamente significativo para  $p \leq 0,05$ .

Em relação ao consumo de bebida alcoólica, o gene *XPC* apresentou diminuição da expressão frente aos agricultores que não são etilistas ( $p=0,001$ ) (Figura 24).

**Figura 24.** Nível de expressão do gene *XPC* em relação ao consumo de bebida alcoólica.

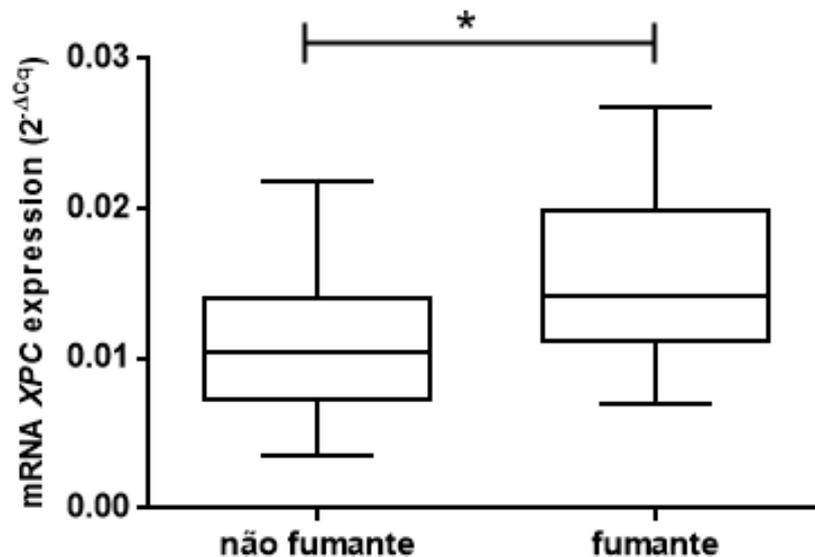


		Nível de Expressão ( $\Delta Cq$ )						Teste de Levene	p-valor <sup>†</sup>
		N	%	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo		
Consumo de bebida alcoólica	Não etilista	22	41,5	0,1202690	0,004526	0,0060065	0,0218518	0,001	*0,024
	Etilista	31	58,5	0,0164771	0,009115	0,0034934	0,363696		

<sup>†</sup>Teste *t de Student*. Teste de Levene - Teste de homogeneidade de variâncias.  
Valor estatisticamente significativo para  $p \leq 0,05$ .

Quanto ao tabagismo, observou-se que o perfil de expressão do gene *XPC* para agricultores não fumantes apresenta-se menor em relação aqueles que possuem o hábito de fumar ( $p=0,017$ ) (Figura 25).

**Figura 25.** Nível de expressão do gene *XPC* quanto ao tabagismo.

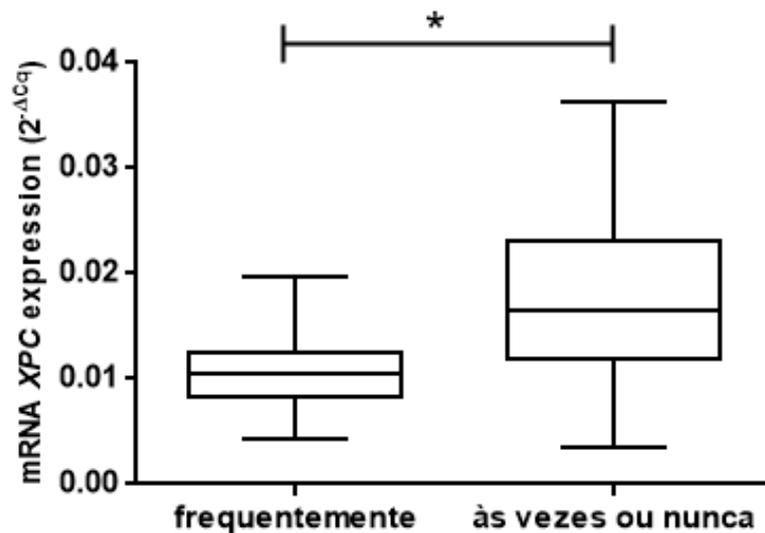


		Nível de Expressão ( $\Delta Cq$ )							
		N	%	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	Teste de Levene	p-valor†
Tabagismo	Não fumante	33	71,7	0,0112412	0,004927	0,0034934	0,218518	<b>0,586</b>	<b>*0,017</b>
	Fumante	13	28,3	0,0153932	0,005502	0,0069358	0,0268426		

†Teste *t de Student*. Teste de Levene - Teste de homogeneidade de variâncias.  
 Valor estatisticamente significativo para  $p \leq 0,05$ .

Frente ao uso de EPI's, identificou-se associação significativa do nível de expressão do gene *XPC* somente para variável uso de máscara. Trabalhadores que frequentemente usam o equipamento apresentaram perfil de expressão do gene *XPC* menor do que aqueles que às vezes ou nunca usam máscara ( $p= 0,001$ ) (Figura 26).

**Figura 26.** Nível de expressão do gene *XPC* quanto ao uso de máscara.



		Nível de Expressão ( $\Delta Cq$ )							
		N	%	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	Teste de Levene	p-valor†
Uso de EPI - máscara	Frequentemente	17	34,6	0,0109715	0,004179	0,0043820	0,0197836	0,007	*0,001
	Às vezes ou nunca	32	65,3	0,0173394	0,008333	0,0034934	0,0363696		

†Teste *t de Student*. Teste de Levene - Teste de homogeneidade de variâncias.  
Valor estatisticamente significativo para  $p \leq 0,05$ .

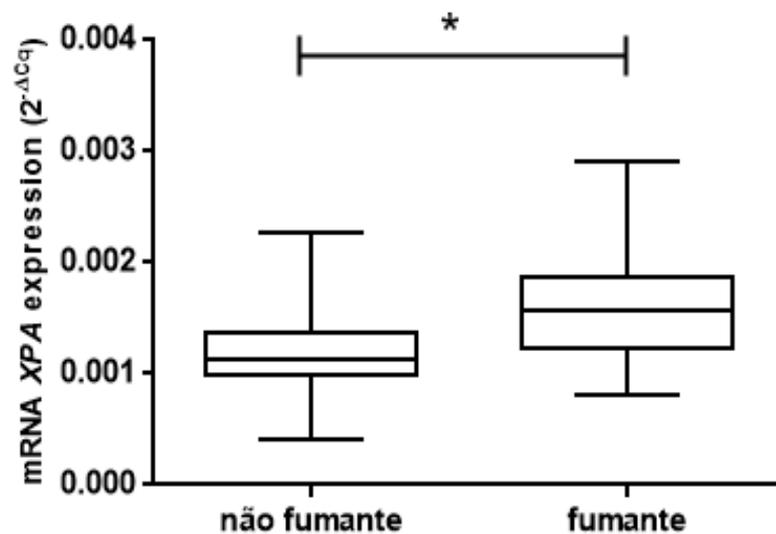
Não foram identificadas associações significantes entre os grupos de trabalhadores, assim como para associação entre agricultores expostos e não expostos, para o tipo de contato, para o uso dos EPI's macacão, luvas, óculos e botas, para o resultado do cariótipo, para histórico de câncer e para lavagem dos EPI's em casa ou no trabalho. Essas variáveis obtiveram valores de  $p$  superiores a 0,05 sendo consideradas não significantes na análise de expressão.

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

Para o gene *XPA* verificaram-se associações importantes quanto ao tabagismo, tipo de contato com agrotóxicos e para o uso de máscara.

Em relação ao tabagismo, observou-se que agricultores não fumantes demonstram um nível de expressão do gene *XPA* inferior aos agricultores fumantes ( $p=0,003$ ) (Figura 27).

**Figura 27.** Nível de expressão do gene *XPA* em relação ao tabagismo.



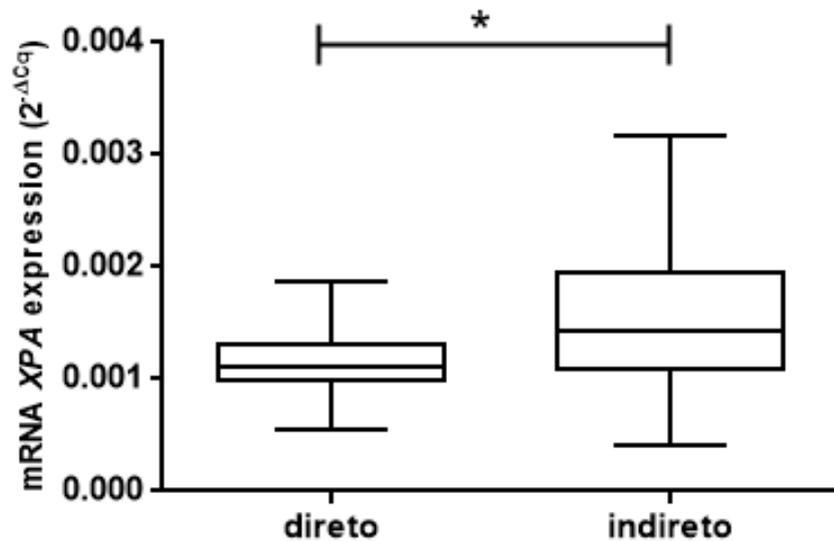
		Nível de Expressão ( $\Delta Cq$ )							
		N	%	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	Teste de Levene	p-valor†
Tabagismo	Não fumante	35	72,9	0,0011777	0,0003727	0,0004094	0,0022780	0,245	*0,003
	Fumante	13	27,1	0,0016063	0,0005401	0,0008060	0,0029078		

†Teste *t de Student*. Teste de Levene - Teste de homogeneidade de variâncias.

Valor estatisticamente significante para  $p \leq 0,05$ .

Quanto ao tipo de contato, verificou-se que agricultores que tinham contato direto com o agrotóxico durante o trabalho possuem expressão do gene *XPA* menor em relação a trabalhadores que tinham contato indireto ( $p=0,016$ ) (Figura 28).

**Figura 28.** Nível de expressão do gene *XPA* quanto ao tipo de contato ao agrotóxico.

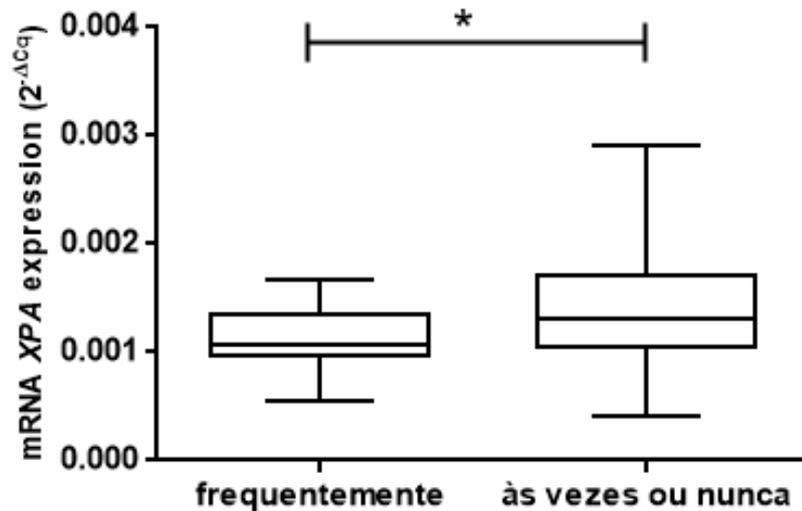


		Nível de Expressão ( $\Delta Cq$ )						Teste de Levene	p-valor†
		N	%	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo		
Tipo de contato	Direto	24	54,6	0,0011512	0,000298	0,0005408	0,0018695	0,002	*0,016
	Indireto	20	45,4	0,0016198	0,000761	0,0004094	0,0031768		

†Teste *t de Student*. Teste de Levene - Teste de homogeneidade de variâncias.  
Valor estatisticamente significativo para  $p \leq 0,05$ .

Em relação ao uso de máscara, observou-se que a expressão do gene *XPA* está diminuída em trabalhadores que frequentemente usam o equipamento de proteção quando comparados com aqueles que usam esporadicamente ( $p=0,030$ ) (Figura 29).

**Figura 29.** Nível de expressão do gene *XPA* em relação a frequência do uso de máscara.



		Nível de Expressão ( $\Delta Cq$ )							
		N	%	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	Teste de Levene	p-valor <sup>‡</sup>
Uso de EPI - máscara	Frequentemente	17	34,6	0,0011129	0,00026	0,0005408	0,0016600	0,007	*0,001
	Às vezes ou nunca	32	65,3	0,0013829	0,00052	0,0004094	0,0029078		

<sup>‡</sup>Teste *t de Student*. Teste de Levene - Teste de homogeneidade de variâncias.

Valor estatisticamente significativo para  $p \leq 0,05$ .

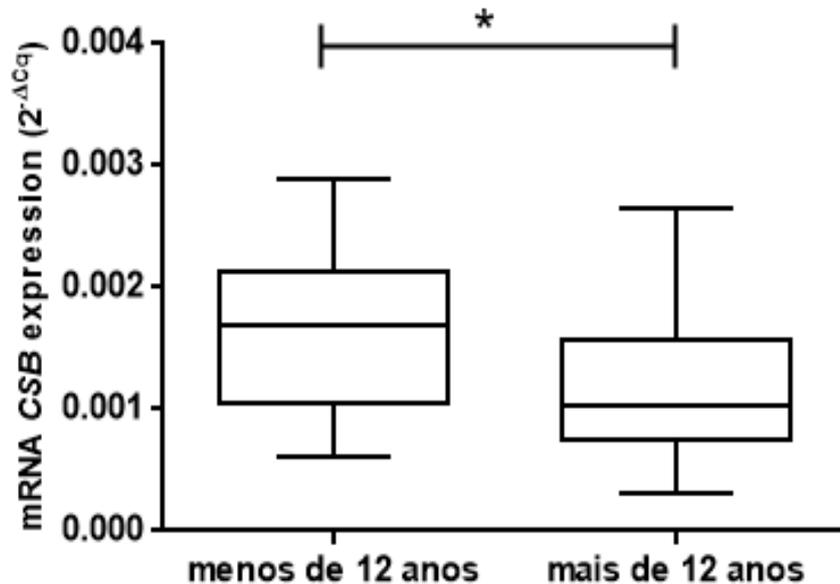
Para este gene não foram identificadas associações significantes para as seguintes variáveis: grupos dos agricultores, expostos e não expostos, tempo de exposição, etilismo, Uso de EPI's (macacão, luvas, botas e óculos), cariótipo, histórico de câncer e lavagem de EPI's em casa ou no trabalho. Tais variáveis obtiveram p-valores superiores a 0,05.

#### 4.3.4. Análise do nível de expressão do gene *CSB*

As análises para o gene *CSB* mostraram associações significantes frente as variáveis avaliadas nesta pesquisa.

Quanto ao tempo de exposição a agrotóxicos e trabalho na agricultura, observou-se que trabalhadores expostos a mais de 12 anos apresentam um nível de expressão do gene *CSB* menor em relação a trabalhadores expostos por tempo inferior a 12 anos ( $p= 0,05$ ) (Figura 30).

**Figura 30.** Nível de expressão do gene *CSB* frente ao tempo de exposição a agrotóxicos.



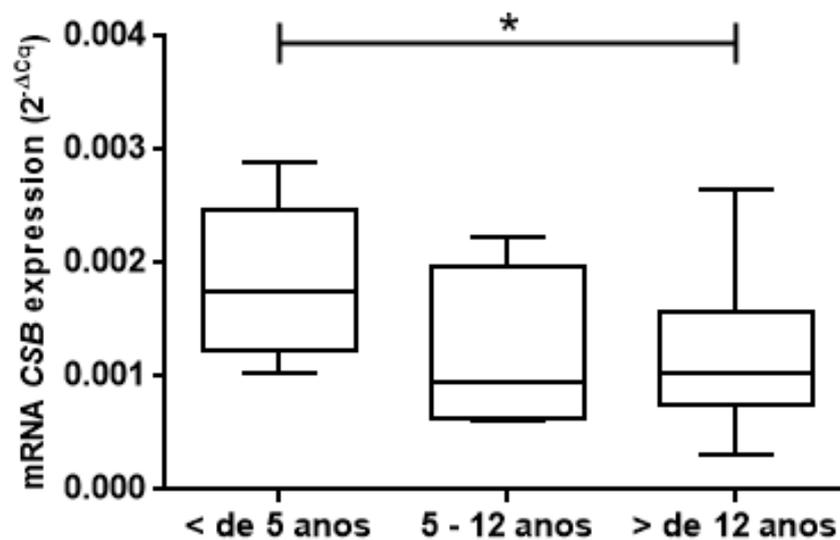
		Nível de Expressão ( $\Delta Cq$ )							
		N	%	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	Teste de Levene	p-valor†
Tempo de exposição a agrotóxicos	Menos de 12 anos	12	23,6	0,0016185	0,000731	0,0006081	0,0018247	0,388	*0,05
	Mais de 12 anos	39	76,4	0,0012073	0,000586	0,0003037	0,0034931		

†Teste *t de Student*. Teste de Levene - Teste de homogeneidade de variâncias.

Valor estatisticamente significativa para  $p \leq 0,05$ .

Quando se estratificou o tempo de trabalho na agricultura e consequente exposição aos agrotóxicos observou-se associação significativa para expressão do gene *CSB*. Agricultores com exposição de mais de 12 anos mostraram um nível de expressão menor frente aqueles que demonstram exposição inferior a 5 anos ( $p= 0,029$ ) (Figura 31). Não houve associação significativa para o grupo exposto por 5 a 12 anos.

**Figura 31.** Nível de expressão do gene *CSB* frente ao tempo de exposição na agricultura estratificado.

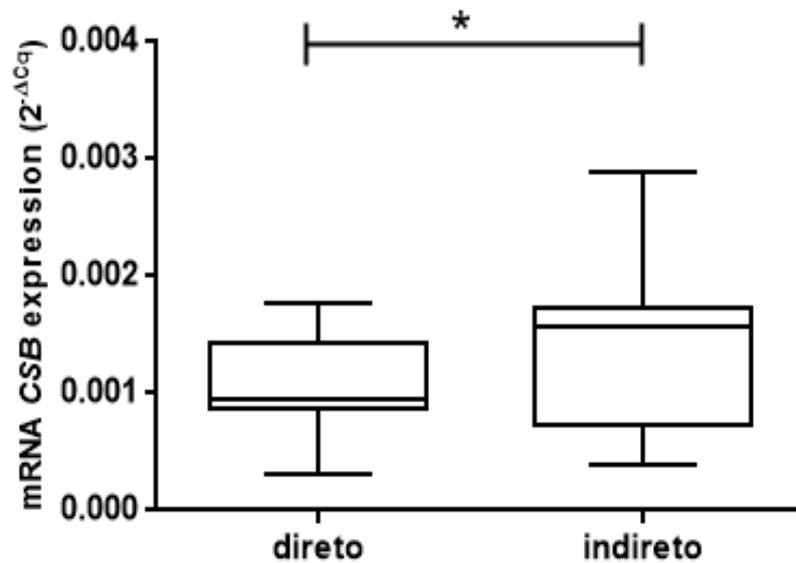


		Nível de Expressão ( $\Delta Cq$ )								
		N	%	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	ANOVA†	Teste de Levene	Tukey <i>pos-hoc</i> test
Tempo de exposição estratificado	< 5 anos	8	14,1	0,001834	0,000665	0,001035	0,002898	<b>0,035</b>	0,961	<b>*0,029</b>
	5 – 12 anos	4	7	0,001186	0,000745	0,000608	0,002234			-
	>12 anos	45	78,9	0,001207	0,000586	0,000303	0,002654			<b>*0,029</b>

†ANOVA one-way. Teste de Levene - Teste de homogeneidade de variâncias.  
Valor estatisticamente significativo para  $p \leq 0,05$

Quanto ao tipo de contato, verificou-se que agricultores que tinham contato direto com o agrotóxico durante o trabalho possuem expressão do gene *CSB* menor em relação a trabalhadores que tinham contato indireto ( $p=0,023$ ) (Figura 32).

**Figura 32.** Nível de expressão do gene *CSB* em relação ao tipo de contato.



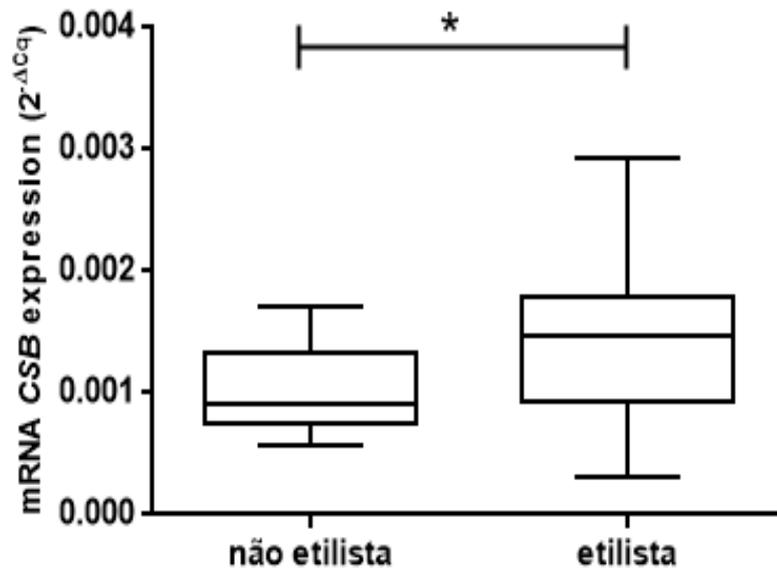
		Nível de Expressão ( $\Delta Cq$ )						Teste de Levene	p-valor†
		N	%	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo		
Tipo de contato	Direto	23	53,5	0,0010537	0,0003943	0,0003037	0,0017796	0,024	*0,023
	Indireto	20	46,5	0,0014814	0,0007062	0,0003931	0,0028981		

†Teste *t de Student*. Teste de Levene - Teste de homogeneidade de variâncias.

Valor estatisticamente significativo para  $p \leq 0,05$ .

Frente ao consumo de bebida alcoólica, o gene *CSB* apresentou diminuição da expressão em relação aos agricultores que não são etilistas ( $p=0,010$ ) (Figura 33).

**Figura 33.** Nível de expressão do gene *CSB* em relação ao consumo de bebida alcoólica.

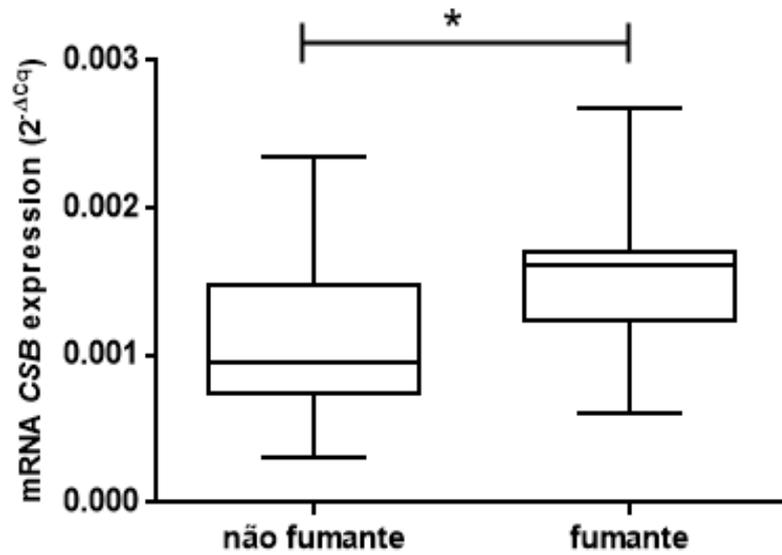


		Nível de Expressão ( $\Delta Cq$ )						Teste de Levene	p-valor <sup>‡</sup>
		N	%	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo		
Consumo de bebida alcoólica	Não etilista	20	40	0,0010313	0,000359	0,0005765	0,0017091	<b>0,01</b>	<b>*0,009</b>
	Etilista	30	60	0,0014610	0,000733	0,0003037	0,0029330		

<sup>‡</sup>Teste *t de Student*. Teste de Levene - Teste de homogeneidade de variâncias.  
Valor estatisticamente significativo para  $p \leq 0,05$ .

Quanto ao tabagismo, verificou-se, assim como no etilismo, uma diminuição da expressão do gene *CSB* para agricultores não fumantes em relação aos fumantes ( $p= 0,0006$ ) (Figura 34).

**Figura 34.** Nível de expressão do gene *CSB* quanto ao tabagismo.

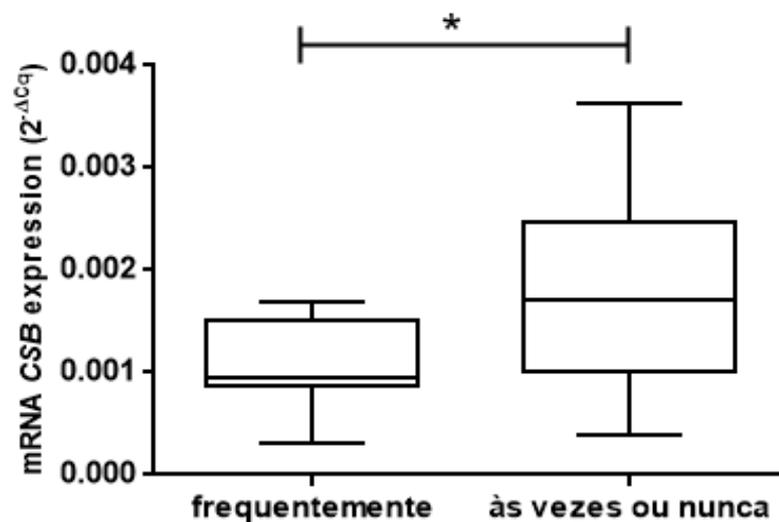


		Nível de Expressão ( $\Delta Cq$ )						Teste de Levene	p-valor†
		N	%	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo		
Tabagismo	Não fumante	35	72,9	0,0011273	0,000519	0,0003037	0,002350	<b>0,683</b>	<b>*0,006</b>
	Fumante	13	27,1	0,0016213	0,000561	0,0006142	0,002731		

†Teste *t de Student*. Teste de Levene - Teste de homogeneidade de variâncias.  
Valor estatisticamente significativo para  $p \leq 0,05$ .

Em relação ao uso de EPI's observou-se associações significantes em relação ao uso dos equipamentos máscara e macacão. Primeiramente, quanto ao uso de máscara, a expressão do gene *CSB* apresentou-se menor para os agricultores que frequentemente usavam o equipamento em relação aqueles que às vezes ou nunca o utilizavam ( $p= 0,002$ ) (Figura. 35).

**Figura 35.** Nível de expressão do gene *CSB* frente ao uso de máscara.



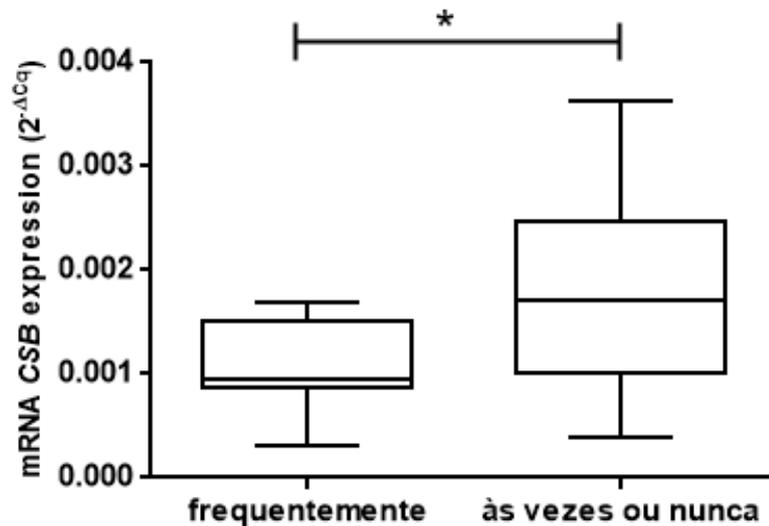
		Nível de Expressão ( $\Delta Cq$ )							
		N	%	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	Teste de Levene	p-valor <sup>‡</sup>
Uso de EPI - máscara	Frequentemente	18	35,3	0,0011013	0,00038	0,0003037	0,0026000	0,003	*0,002
	Às vezes ou nunca	33	64,7	0,0017094	0,00090	0,0003931	0,0036285		

<sup>‡</sup>Teste *t de Student*. Teste de Levene - Teste de homogeneidade de variâncias.

Valor estatisticamente significativo para  $p \leq 0,05$ .

Referente ao uso do macacão, evidenciou-se que a expressão do gene *CSB* também se mostrou menor expresso em agricultores que frequentemente usam o equipamento em relação aqueles que usam de forma esporádica ( $p= 0,026$ ) (Figura 36).

**Figura 36.** Nível de expressão do gene *CSB* em relação ao uso de macacão.



		Nível de Expressão ( $\Delta Cq$ )							Teste de Levene	p-valor <sup>‡</sup>
		N	%	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo			
Uso de EPI - macacão	Frequentemente	20	40,8	0,0012427	0,000554	0,0003037	0,0016887	0,012	*0,026	
	Às vezes ou nunca	29	59,2	0,0017448	0,009695	0,0003931	0,0036285			

‡Teste *t de Student*. Teste de Levene - Teste de homogeneidade de variâncias.

Valor estatisticamente significativo para  $p \leq 0,05$ .

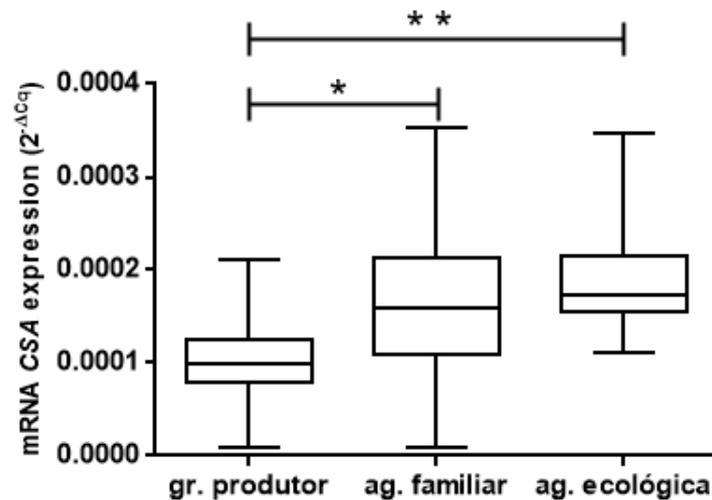
Não foram identificadas associações significantes entre o nível de expressão do gene *CSB* e as variáveis: grupos dos agricultores, grupos exposto e não exposto, uso de EPI's (luvas, óculos e botas), resultado do cariótipo, histórico de câncer e lavagem de EPI's. Essas não obtiveram p-valores significantes ( $p > 0,05$ ).

#### 4.3.5. Análise do nível de expressão do gene CSA

Frente às análises do gene *CSA*, verificaram-se importantes associações do nível de expressão deste gene em relação aos grupos de produção dos trabalhadores, assim como os grupos diferenciados em expostos e não expostos, consumo de bebida alcoólica e uso de máscara.

Primeiramente, quanto aos grupos de produção em que estão distribuídos os agricultores, verificou-se diminuição da expressão do gene *CSA* do grupo grande produtor em relação ao grupo agricultura familiar ( $p= 0,000$ ) (Figura 37). Adicionalmente, a expressão do gene *CSA* também está diminuída para o grupo grande produtor quando comparada ao grupo agricultura ecológica ( $p= 0,000$ ) (Figura 37).

**Figura 37.** Nível de expressão do gene *CSA* quanto aos grupos de produção no qual estão inseridos os agricultores rurais.



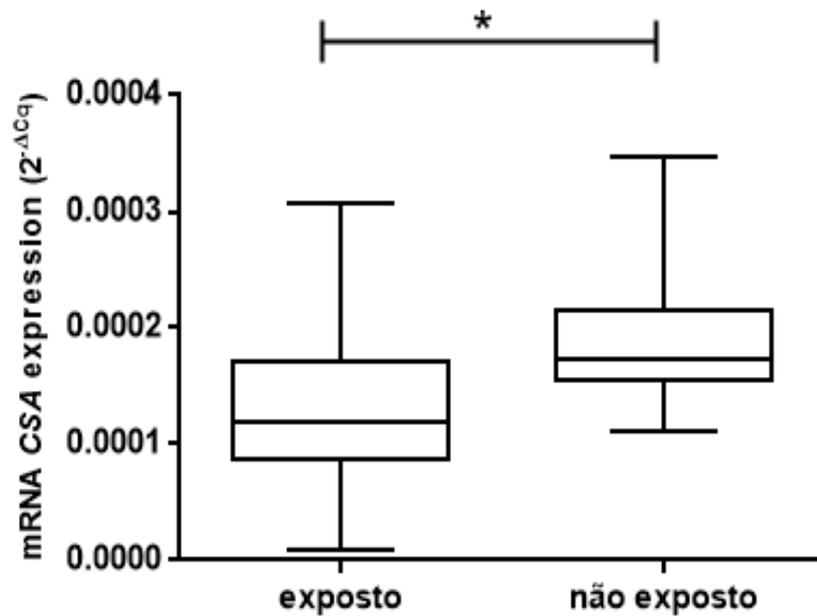
		Nível de Expressão ( $\Delta Cq$ )						ANO VA†	Teste de Levene	Tukey <i>pos-hoc</i> test
		N	%	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo			
Grupos de produção dos agricultores	Grande produtor	39	54,9	0,0001150	0,0000563	0,000008	0,0002348	0,000	0,092	*0,000
	Agricultura Familiar	23	32,3	0,0001573	0,0000653	0,000088	0,0003065			**0,000
	Agricultura Ecológica	9	12,6	0,0001724	0,0000362	0,000110	0,0002320			*0,00

†Teste *t de Student*. Teste de Levene - Teste de homogeneidade de variâncias.

Valor estatisticamente significativo para  $p \leq 0,05$ .

Ao observarmos os grupos grande produtor e agricultura familiar e analisarmos como único grupo e considerando-o como grupo exposto a agrotóxicos, observamos que o nível de expressão do gene CSA se mostrou baixo expresso quando comparado com o grupo considerado não exposto (grupo da agricultura ecológica) ( $p= 0,009$ ) (Figura 38).

**Figura 38.** Nível de expressão do gene CSA para o grupo exposto (grande produtor e agricultura familiar) e grupo não exposto (agricultura ecológica).



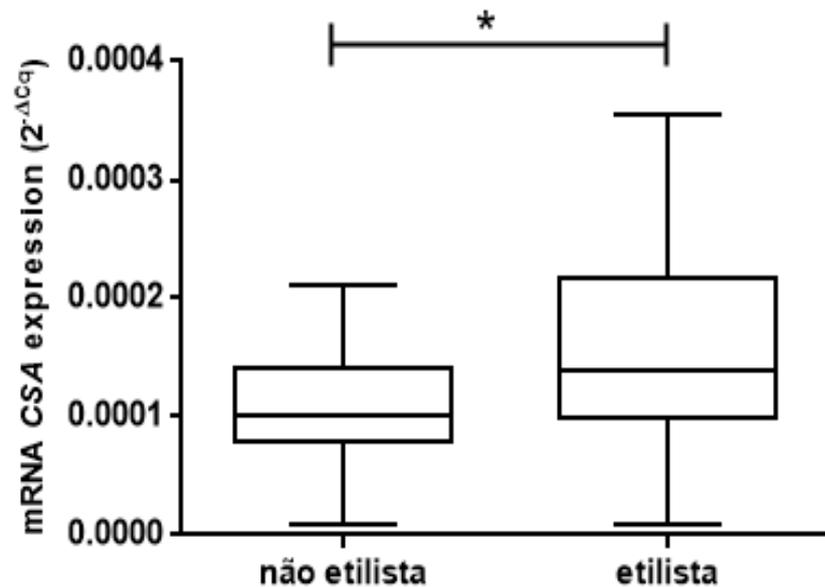
		Nível de Expressão ( $\Delta Cq$ )							
		N	%	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	Teste de Levene	p-valor <sup>‡</sup>
Exposição a agrotóxicos	Expostos	59	87,8	0,0001307	0,0000627	0,000088	0,0003065	0,730	*0,009
	Não expostos	9	12,2	0,0001918	0,0000674	0,0001104	0,0003473		

<sup>‡</sup>Teste *t de Student*. Teste de Levene - Teste de homogeneidade de variâncias.

Valor estatisticamente significante para  $p \leq 0,05$ .

Quanto ao etilismo, verificou-se que que agricultores que não possuem o hábito de consumir bebida alcoólica apresentam o nível de expressão do gene CSA diminuído em relação a agricultores etilistas ( $p= 0,023$ ) (Figura 39);

**Figura 39.** Nível de expressão do gene CSA frente ao consumo de bebida alcoólica.



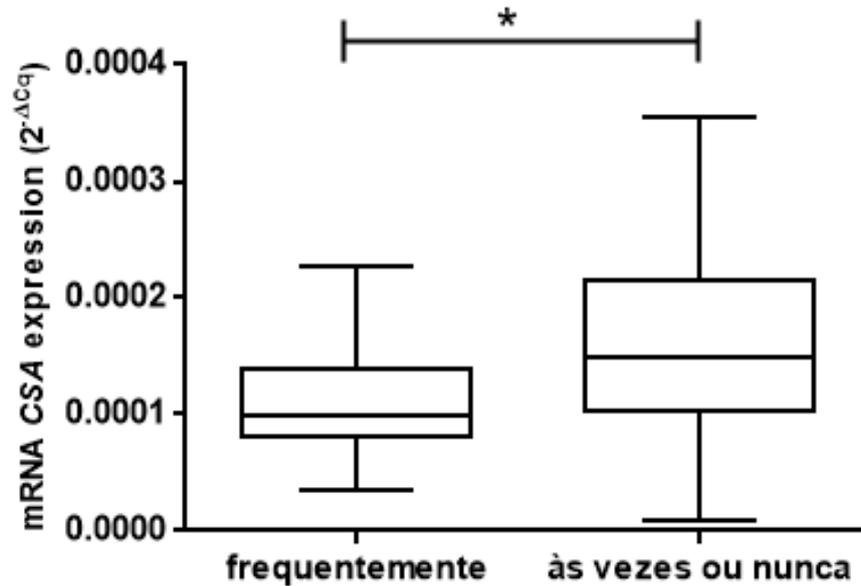
		Nível de Expressão ( $\Delta Cq$ )						Teste de Levene	p-valor†
		N	%	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo		
Consumo de bebida alcoólica	Não etilista	24	42,8	0,0001084	0,000053	0,0000088	0,0002119	0,118	*0,023
	Etilista	32	57,2	0,0001506	0,000759	0,0000088	0,0003546		

†Teste *t de Student*. Teste de Levene - Teste de homogeneidade de variâncias.

Valor estatisticamente significativo para  $p \leq 0,05$ .

Finalmente, quanto ao uso de máscara, trabalhadores que frequentemente usam máscara mostraram nível de expressão do gene *CSA* menor quando comparado com aqueles que às vezes ou nunca usam o equipamento ( $p= 0,018$ ) (Figura 40).

**Figura 40.** Nível de expressão do gene *CSA* em relação ao uso de máscara.



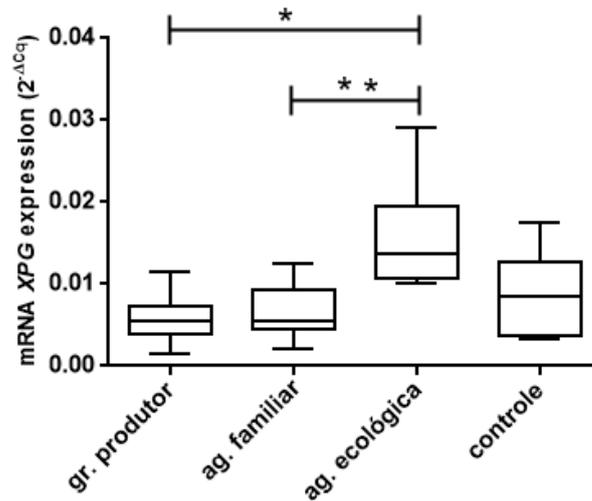
		Nível de Expressão ( $\Delta Cq$ )							
		N	%	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	Teste de Levene	p-valor†
Uso de EPI - máscara	Frequentemente	19	35,8	0,0001104	0,00004	0,0000353	0,0002279	<b>0,02</b>	<b>*0,018</b>
	Às vezes ou nunca	34	64,2	0,0001549	0,00008	0,0000088	0,0003546		

Não foram identificadas associações significantes entre o nível de expressão do gene *CSA* e as variáveis tempo de exposição, tipo de contato, uso de EPI's (luvas, óculos e botas), cariótipo, histórico de câncer e lavagem de EPI's. As mesmas obtiveram p-valores maior que 0,05, considerando-os não significantes.

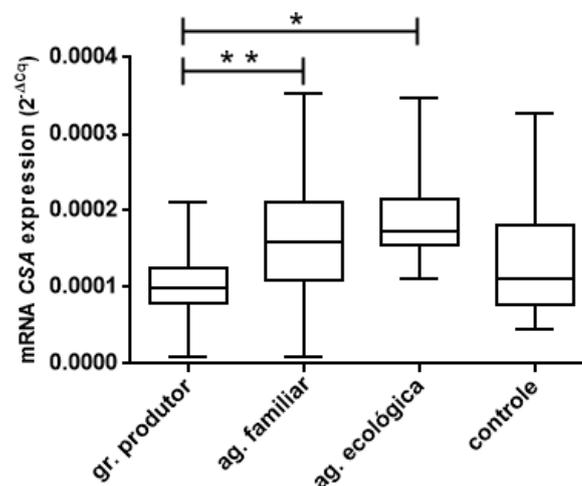
Os principais resultados de expressão avaliados de forma significativa encontram-se resumidos na figura 42. As setas indicam que os genes estão com a expressão aumentada (para cima) ou baixo expressos (para baixo).

As análises das variáveis em relação aos controles saudáveis não obtiveram resultados significantes, no entanto ressalta-se a diferença de média entre os grupos expostos (agricultura familiar e grande produtor), não expostos (agricultura ecológica) com o grupo controle saudável para os genes XPG (figura 41) e para o gene CSB (figura 42). Os valores significantes referentes aos grupos grande produtor, agricultura familiar e agricultura ecológica se encontram nas figuras 13 e 35 já demonstradas anteriormente.

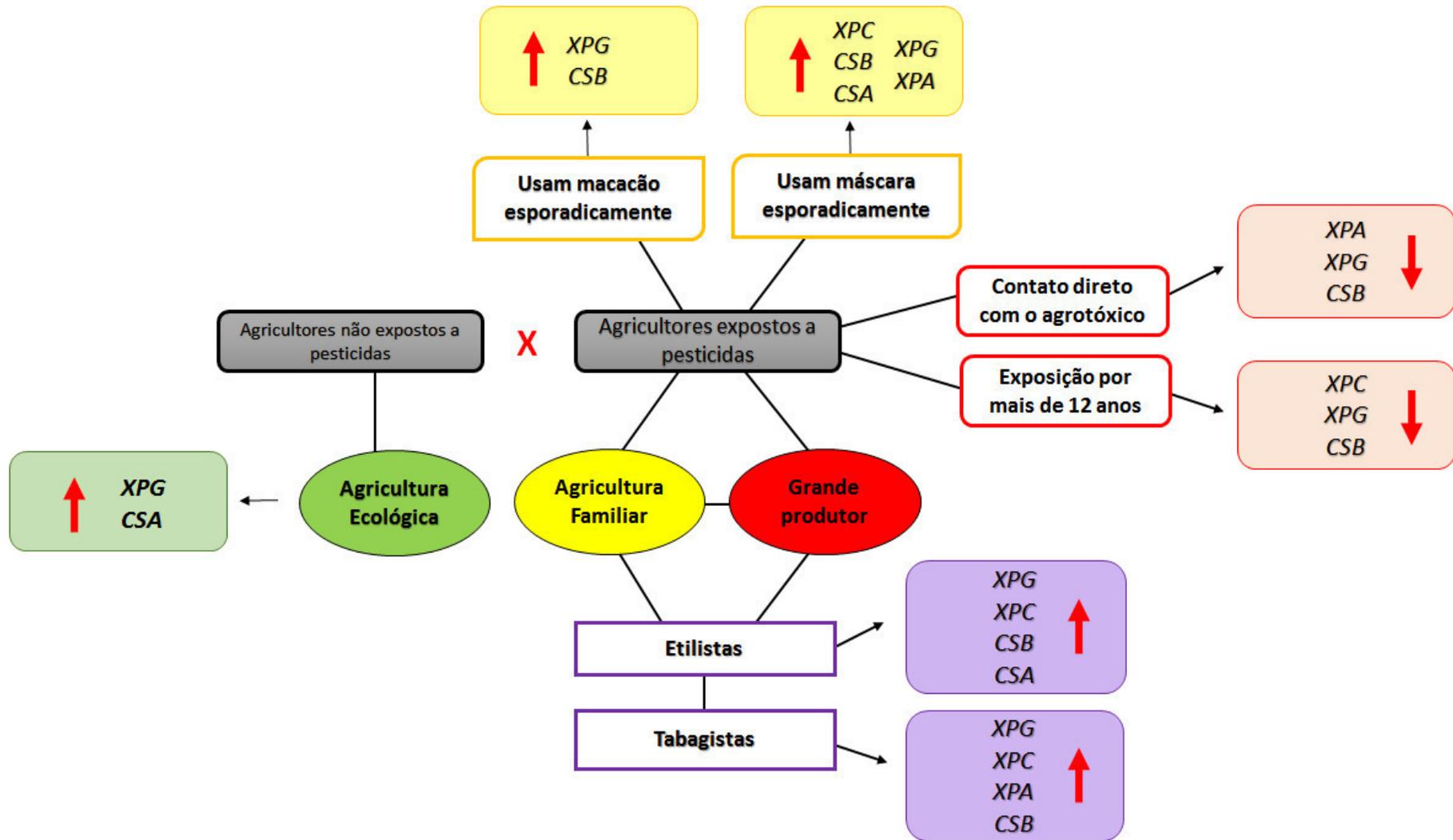
**Figura 41.** Nível de expressão do gene *XPG* frente os grupos em que estão inseridos os agricultores e o grupo controle saudável.



**Figura 42.** Nível de expressão do gene *CSA* frente os grupos em que estão inseridos os agricultores e o grupo controle saudável.



**Figura 43.** Esquema de caracterização dos principais resultados de expressão avaliados nesse estudo.



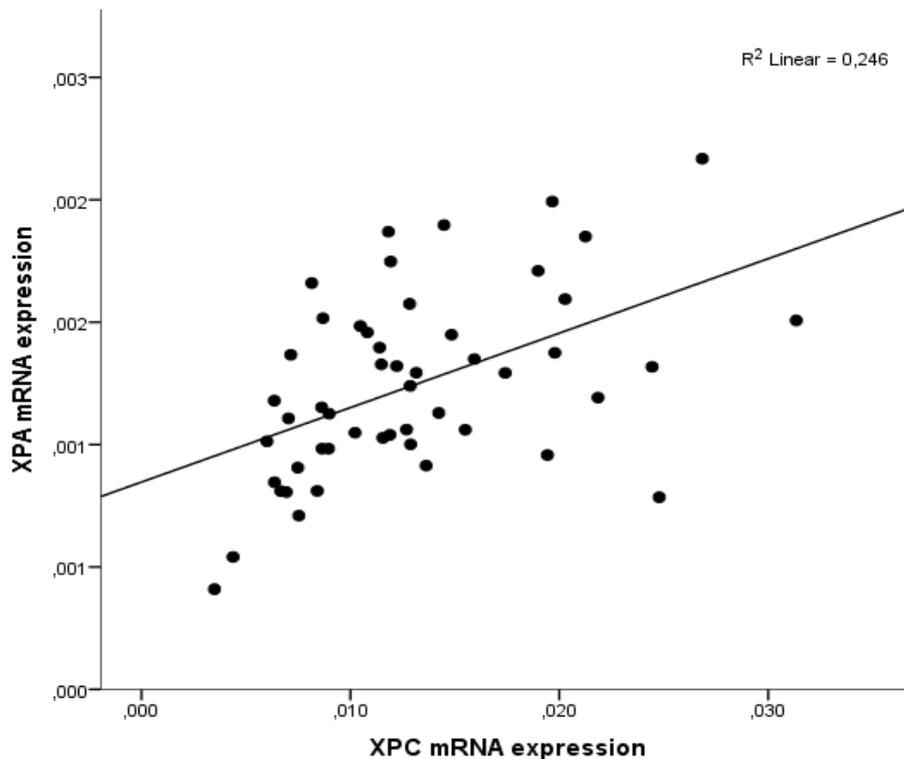
#### 4.4 Análises de correlação entre os níveis de expressão dos genes relacionados aos mecanismos de reparo em danos de fita simples do DNA

Para avaliarmos a correlação entre os genes utilizou-se o teste de correlação de *Pearson* (R) e obtenção do  $r^2$  (*R square*), no qual analisa a influência da expressão de cada gene sobre a expressão dos demais genes, a fim de caracterizar o comportamento de determinado mecanismo de reparo na população dos agricultores avaliados nesse estudo.

Admitindo-se, valores de “r” de 0,1 a 0,3 para correlação fraca, 0,3 a 0,5 para correlação moderada e acima de 0,5 para correlação forte. Valores de correlação significativos com  $p < 0,05$ .

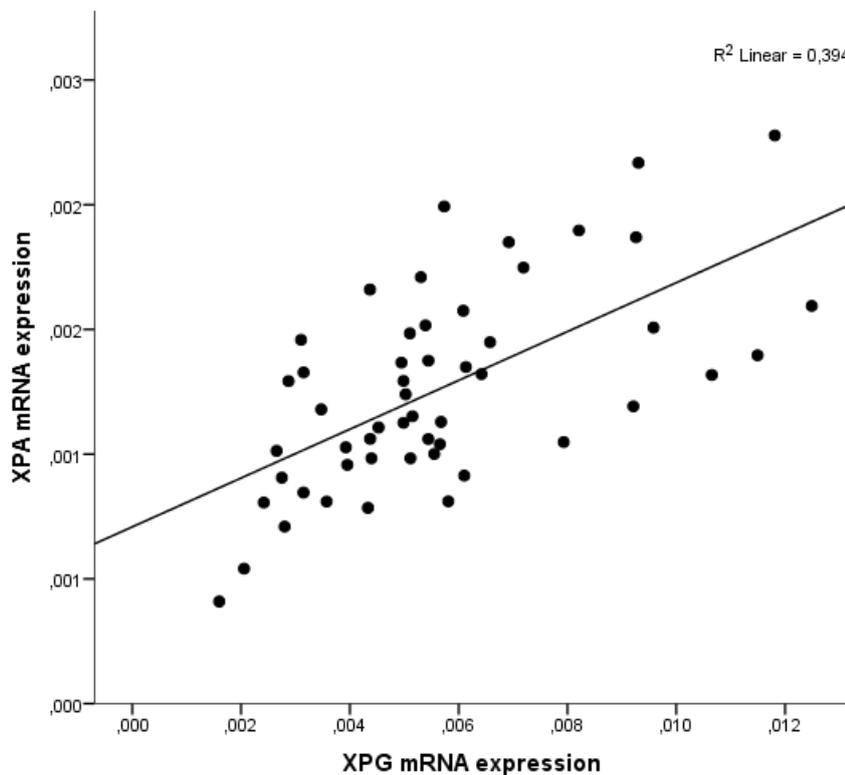
Inicialmente, observou-se que há uma moderada correlação entre o gene XPA e o gene XPC ( $r = 0,496$ ;  $p = 0,000$ ), demonstrando que esses genes são responsáveis por 24,6% ( $r^2 = 0,246$ ) da variação dos seus respectivos níveis de expressão em agricultores rurais (Figura 44).

**Figura 44.** Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes XPA e XPC em agricultores rurais.



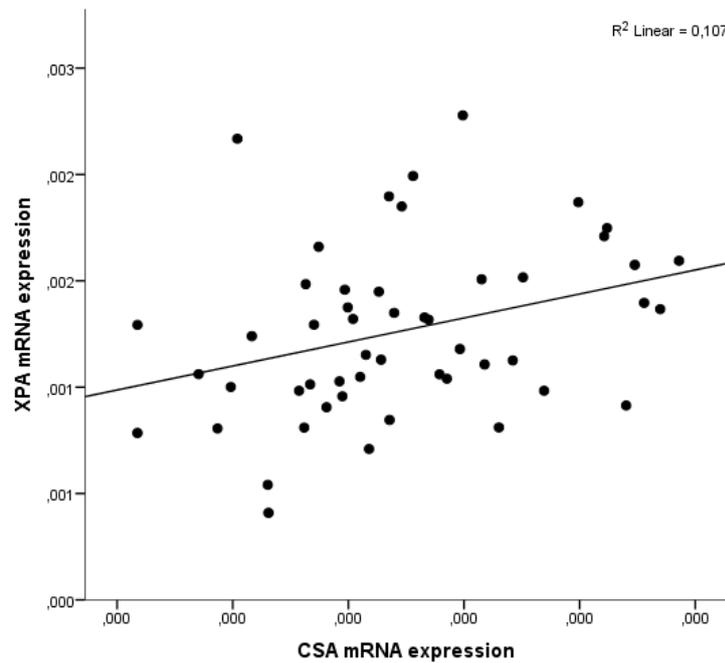
Adicionalmente, foi identificado que há uma forte correlação entre os genes *XPA* e o gene *XPG* ( $r= 0,627$ ;  $p= 0.000$ ), mostrando que estes genes são responsáveis por 39,4% ( $r^2=0.394$ ) da variação dos seus respectivos níveis de expressão em agricultores rurais (Figura 45).

**Figura 45.** Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes *XPA* e *XPG* em agricultores rurais.

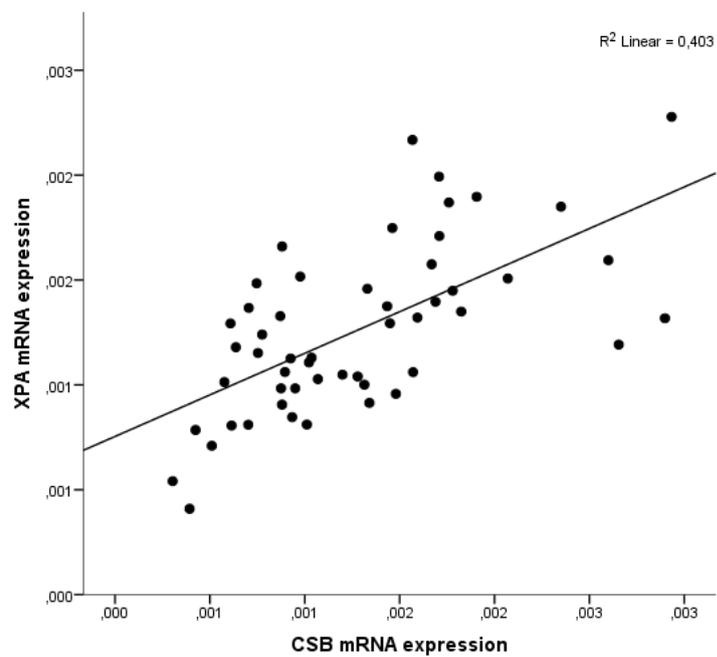


Em seguida, observou-se que há uma correlação moderada entre os níveis de expressão dos genes *XPA* e *CSA* ( $r=0.327$ ;  $p= 0.019$ ) e forte entre os genes *XPA* e *CSB* ( $r=0.635$ ;  $p= 0.000$ ). Estes dados demonstram que o gene *XPA* influencia 10,7% ( $r^2=0.107$ ) (Figura 46) e 40,3% ( $r^2=0.403$ ) (Figura 47) do nível de expressão dos genes *CSA* e *CSB*, respectivamente.

**Figura 46.** Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes *XPA* e *CSA* em agricultores rurais.

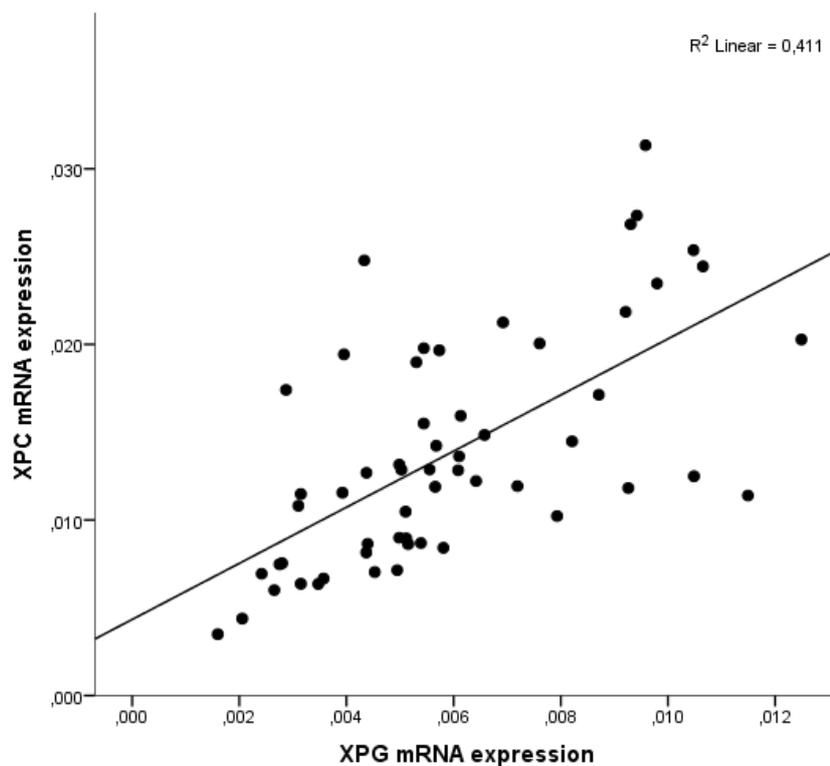


**Figura 47.** Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes *XPA* e *CSB* em agricultores rurais.



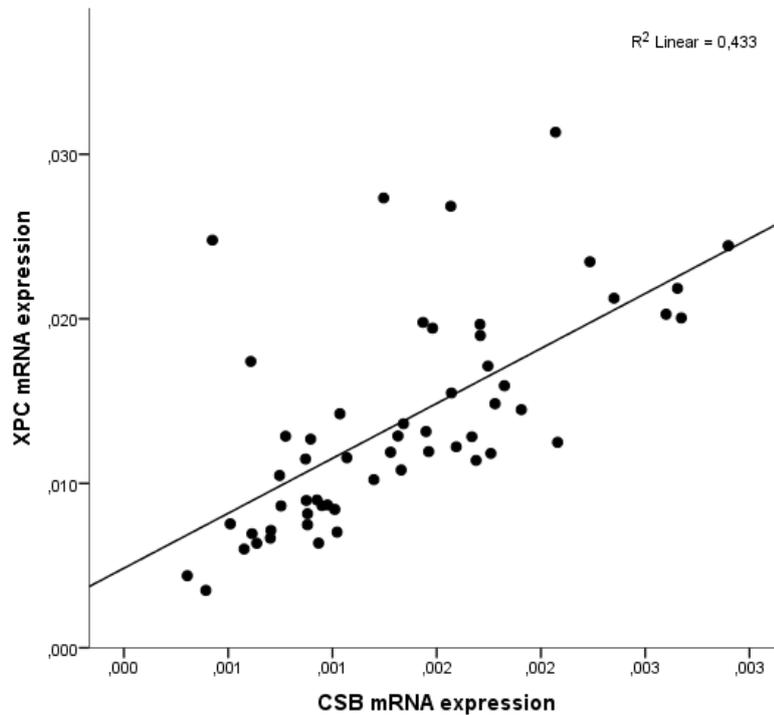
Observamos que há uma forte correlação entre os genes *XPC* e o gene *XPG* ( $r= 0,641$ ;  $p= 0.000$ ), mostrando que estes genes são responsáveis por 41,1% ( $r^2=0.411$ ) da variação dos seus respectivos níveis de expressão em agricultores rurais (Figura 48).

**Figura 48.** Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes *XPC* e *XPG* em agricultores rurais.



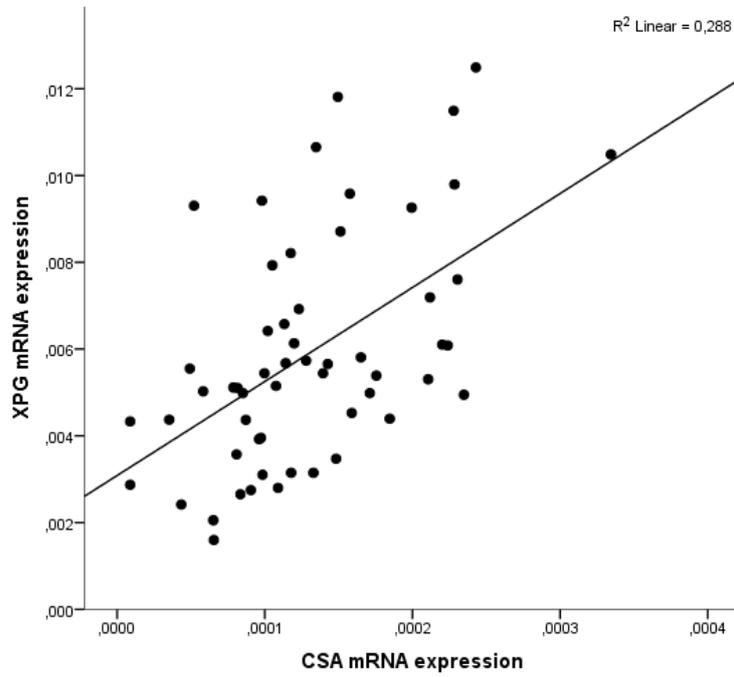
Além disso, também se evidenciou uma forte correlação entre o gene *XPC* e o gene *CSB* ( $r= 0,658$ ;  $p= 0.000$ ), mostrando que estes genes são responsáveis por 43,3% ( $r^2=0.433$ ) da variação dos seus respectivos níveis de expressão em agricultores rurais (Figura 49).

**Figura 49.** Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes *XPC* e *XPG* em agricultores rurais.

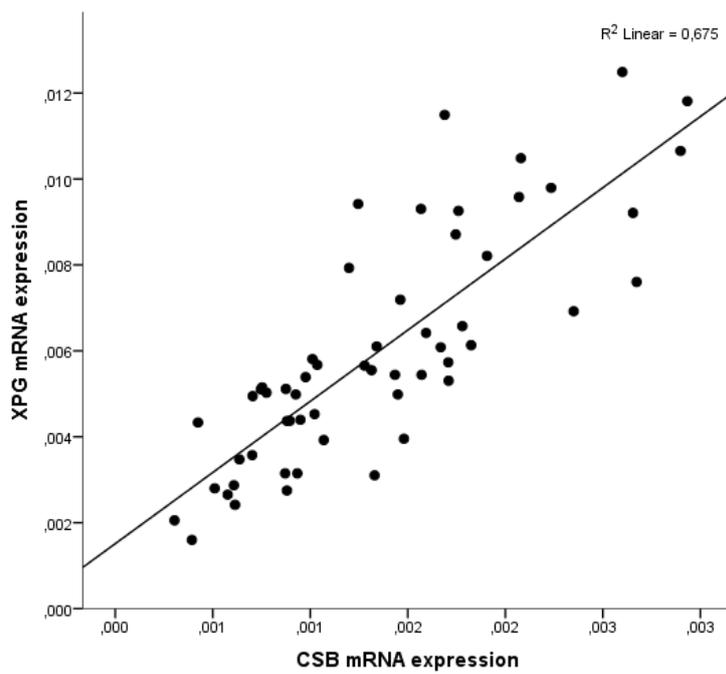


Adicionalmente, observou-se que há uma correlação forte entre os níveis de expressão dos genes *XPG* e *CSA* ( $r=0.536$ ;  $p= 0,000$ ) e também entre os genes *XPG* e *CSB* ( $r=0.821$ ;  $p= 0.000$ ). Estes dados demonstram que o gene *XPG* influencia 28,8% ( $r^2=0.288$ ) (Figura 50) e 67,5% ( $r^2=0.675$ ) (Figura 51) do nível de expressão dos genes *CSA* e *CSB*, respectivamente.

**Figura 50.** Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes *XPG* e *CSA* em agricultores rurais.

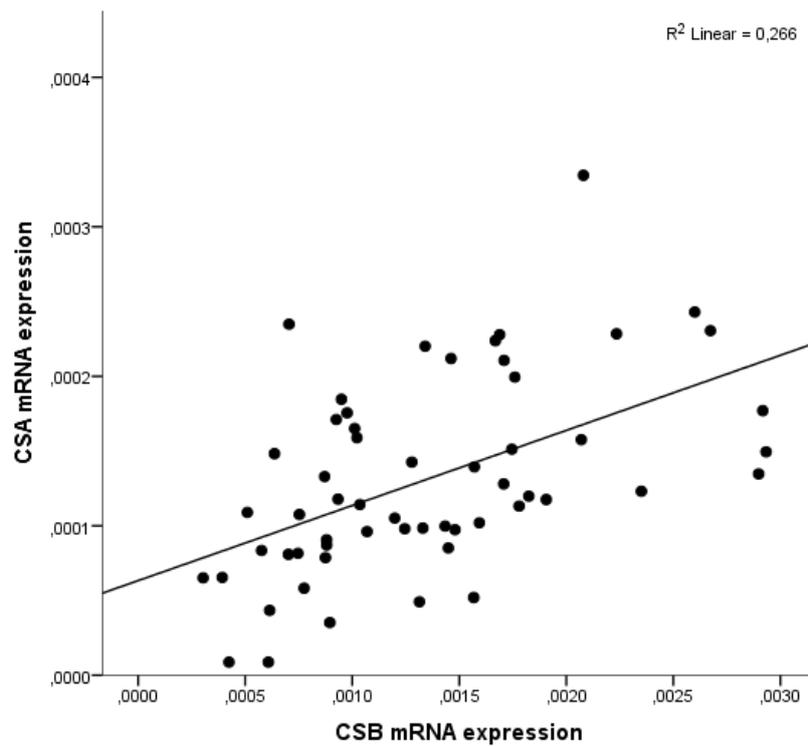


**Figura 51.** Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes *XPG* e *CSA* em agricultores rurais.



Por fim, observou-se que há uma correlação forte entre os níveis de expressão dos genes *CSA* e *CSB* ( $r=0.515$ ;  $p<0.000$ ) demonstrando que o gene *CSA* influencia 26,6% ( $r^2=0.266$ ) do nível de expressão do gene *CSB* e vice-versa (Figura 48).

**Figura 52.** Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes *CSA* e *CSB* em agricultores rurais.



Não foi observado correlação significativa ( $p<0,05$ ) entre o nível de expressão dos genes *XPC* e *CSA*.

## 5. DISCUSSÃO

Com o presente estudo realizamos a primeira avaliação de genes de reparo em amostras de medula óssea em agricultores rurais expostos a agrotóxicos. Nossos dados demonstraram que a maior parte dos trabalhadores avaliados neste estudo estão inseridos no grupo do agronegócio (55,5%), caracterizado por trazer ao trabalhador rural situações de vulnerabilidade ocupacional, sanitária, ambiental e social. Em seguida se encontra o grupo da agricultura familiar ou pequeno produtor, o qual corresponde a 33,3% dos agricultores, grupo este com condições diminuídas para investir em instalações e equipamentos adequados para armazenamento, higienização e proteção (CARNEIRO et al., 2012).

A prevalência do grupo do agronegócio na região se dá, principalmente, devido ser uma região voltada para a fruticultura de exportação, além disso a ocupação de extensas áreas por monoculturas caracteriza o modo de produção do agronegócio, bastante evidenciado na região de Limoeiro do Norte (CARNEIRO et al., 2012).

Outro grupo em que estão inseridos os agricultores é o da agricultura ecológica, correspondendo a 11,1% dos trabalhadores. Esse meio de produção substitui o uso de agrotóxicos por métodos naturais e/ou de controle biológico de pragas agrícolas e microrganismos patogênicos. Tem como base o equilíbrio ecológico, protegendo os agricultores e o meio ambiente. No entanto, a luta contra o modelo dominante envolve muitos aspectos políticos e sociais, tornando o agronegócio um modelo que necessita de contribuições e apoio de setores governamentais (CARNEIRO et al., 2012).

A idade média dos agricultores nesse estudo foi de 45 anos e em relação ao gênero houve prevalência para o gênero masculino, correspondendo a 97,7%. Idade e gênero são condições que contribuem para maior suscetibilidade individual de maneira que crianças, idosos e mulheres em idade fértil constituem grupos populacionais de especial risco relacionado aos agrotóxicos (WOODRUFF, ZOTA; SCHWARTZ, 2011). Em um estudo realizado por Benatto (2002) envolvendo agrotóxicos no Brasil mostrou que as intoxicações se concentraram em indivíduos do sexo masculino entre 15 e 49 anos, mostrando que a nossa população de estudo se enquadra a esses dados.

Ao avaliarmos o tempo de exposição aos agrotóxicos identificamos que 76% dos trabalhadores sofrem exposição por mais de 12 anos. Assim como ocorre em dados de um estudo realizado com 2.469 fumicultores no sul do Brasil, que demonstrou que 43,1% dos trabalhadores também mostram exposição superior a 12 anos (MEUCCI et al., 2014).

Ao avaliarmos contato com agrotóxicos, a maioria dos agricultores, 58% deles mostraram ter contato direto com o agrotóxico durante o trabalho, o que também pode ser observado no estudo epidemiológico da população do Baixo Jaguaribe exposta a áreas de uso de agrotóxicos realizado por Rigotto em 2011. No estudo, foi evidenciado que o contato direto em cerca de 30% dos trabalhadores do agronegócio e em 60% dos agricultores familiares camponeses. As atividades envolviam a preparação de misturas, a pulverização costal, o trabalho exercido em área recém-pulverizada, o armazenamento e transporte, o descarte de embalagens e a limpeza de roupas (RIGOTTO et al., 2011).

Em relação as atividades exercidas na agricultura, a maior frequência foi de trabalhadores em que exerciam algum tipo de atividade em área pulverizada (36%), seguida da pulverização costal (25%). Mesmo sendo a única forma de pulverização que conta com legislação específica, a pulverização aérea termina por ser a mais perigosa e contaminante (CARNEIRO et al., 2012).

Na região de Limoeiro do Norte, o lançamento dos agrotóxicos por via aérea atinge comunidades fora das áreas de plantação e é responsável pelas frequentes queixas relacionadas aos incômodos de saúde logo após a aplicação, mesmo quando são seguidas as regras da aviação para esse fim (MARINHO et al., 2011). Na Chapada do Apodi, em 2009, foi aprovada uma lei que proibia o a pulverização aérea, no entanto apenas três meses após a aprovação da referida lei, o prefeito de Limoeiro do Norte propôs à Câmara Municipal sua revogação (CARNEIRO et al., 2012). Nos cultivos dos pivôs, na Agropecuária Califórnia, têm sido empregados vários tipos de agrotóxicos e quando se faz pulverização, é comum os moradores mais próximos sentirem mal-estar, como dor de cabeça, tontura, náuseas e indisposição (CARNEIRO et al., 2012).

Em relação ao uso de equipamentos de proteção individual (EPI's) em nosso estudo, apenas 10% dos agricultores fizeram uso de todos os equipamentos recomendados, 6,25% não utilizavam nenhum equipamento e os demais utilizavam frequentemente ou de forma esporádica apenas alguns EPI's. Em um estudo realizado por Waichman (2012), no estado do Amazonas, a não utilização de EPI's se dava por serem caros, desconfortáveis e inadequados para o clima quente da região. No entanto, os riscos devido ao não uso não estavam sendo considerados (WAICHMAN et al., 2012).

Embora os equipamentos os EPI's não sejam eficientes para proteger efetivamente os trabalhadores de intoxicações crônicas, não os utilizar ou fazê-los de forma inadequada contribui para o elevado número de acidentes com agrotóxicos. Por vezes, os motivos

alegados para a não utilização são o fato de os padrões não os disponibilizarem, mas também o desconforto (SCHMIDT; GODINHO, 2006; CASTRO; CONFALONIERI, 2005).

Quanto a análise citogenética, mostramos alterações em 11 casos, no qual 10 destes casos fazem parte dos grupos de agricultores expostos aos agrotóxicos (grande produtor e agricultura familiar), demonstrando, assim, que alterações cromossômicas estão mais evidenciadas em agricultores que sofrem exposição mais intensa. Conforme citado por Koifman et al. (2003) os danos cromossômicos são biomarcadores relevantes para a predisposição ao câncer e o biomonitoramento citogenético é considerado ferramenta importante para avaliar os possíveis efeitos genotóxicos de uma determinada exposição (KOIFMAN; HATAGIMA, 2003).

Nossa pesquisa é a primeira e única a demonstrar alterações cromossômicas em medula óssea de agricultores expostos a agrotóxicos. É interessante notar que alguns pesquisadores já tentaram mostrar estas alterações anteriormente, porém os estudos eram feitos com coletas de sangue periférico e cultura de linfócitos, métodos associados a baixa proliferação de células tronco e que não conseguiram detectar alterações significativas (PAIVA, et al., 2011).

Ao avaliarmos a relação dos agrotóxicos mais utilizados pelos agricultores em nosso estudo, evidenciamos o Roundup®, ou glifosato, e o Gramoxone 200®, ou paraquat, respectivamente. O glifosato representa, sozinho, em torno de 40% do consumo de agrotóxico no Brasil. Além disso, em estudo que avaliou os 128 princípios ativos envolvidos em intoxicações, tanto o glifosato quanto o paraquat foram os agentes tóxicos mais incriminados. O registro desses dois agrotóxicos está sendo reavaliados pela ANVISA (CARNEIRO et al., 2012).

O glifosato, ou Roundup®, como muitas vezes é vendido, tem como principal grupo químico a glicina substituída e estudos recentes têm demonstrado sua relação com sintomas que incluem irritação dos olhos, asma, dor de cabeça, dificuldade para respirar e vertigens (INCA, 2010). Além disso também tem sido evidenciado relação entre a exposição ao glifosato e o desenvolvimento de Linfoma não Hodgkin e mieloma múltiplo (COX, 2004; CLAPP, 2007; INCA, 2010).

A associação de glifosato com dano do DNA já foi relatada em peixes e mamíferos (MOYA et al., 2014). Braz-Mota et al. avaliou os efeitos tóxicos do glifosato em juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*), um peixe muito importante da Amazônia no Brasil, detectando o aumento do dano do DNA em suas células de tambaqui expostas ao glifosato (BRAZ-MOTA et al., 2015). Mais recentemente, Townsend et al. avaliou as concentrações de glifosato no dano do DNA usando células Raji humanas e demonstrou que a citotoxicidade do

glifosato tinha uma natureza citotóxica definitiva em células humanas em altas concentrações, como demonstrado com alto dano no DNA detectado pelo teste de cometas (TOWNSEND et al., 2017). Koller et al. também avaliou o DNA danificado do glifosato na linha celular epitelial bucal derivada de humanos e encontrou efeitos genotóxicos significativos após curta exposição a concentrações que correspondem a uma diluição de 450 vezes de pulverização normalmente utilizada na agricultura (KOLLER et al., 2012). O paraquat também foi associado ao dano do DNA (ALI et al., 1996; FENG et al., 2012) e à regulação negativa das proteínas anti-apoptóticas (HATHAICHOTI et al., 2017). Todos esses resultados reforçam o efeito mutagênico de ambos os pesticidas, mas o mecanismo real de sua indução de danos no DNA ainda não é totalmente compreendido. Nosso relatório é o primeiro a sugerir um possível efeito desses pesticidas na diminuição da expressão de genes de reparo do DNA em células da medula óssea, que podem ter um profundo impacto a jusante, levando a condições crônicas crônicas, como o câncer.

Em relação aos nossos resultados de expressão dos genes de reparo de fita simples do DNA, acreditamos, após avaliação literária, que este é primeiro estudo a avaliar expressão gênica de genes de reparo de fita simples do DNA em amostras de medula óssea de agricultores expostos a agrotóxicos.

Nossas avaliações dos grupos de trabalhadores expostos e não expostos a agrotóxicos mostraram associações significantes para várias variáveis avaliadas no estudo quanto aos genes avaliados. Logo, esse trabalho corrobora com dados da literatura que demonstram os efeitos nocivos dos agrotóxicos, relacionado a efeitos agudos, crônicos, assim como a susceptibilidade do risco de desenvolvimento de câncer devido a exposição aos agrotóxicos. Em um estudo epidemiológico realizado por Rigotto, no qual avaliou 545 agricultores da região de Limoeiro do Norte, Quixeré e Russas, no Ceará, em que praticamente 100% dos agricultores tinham contato com agrotóxico e 30% dos trabalhadores, no momento da entrevista do estudo, apresentavam quadro provável de intoxicação aguda por agrotóxicos (RIGOTTO et al. 2011).

Um estudo tem apontado para os riscos de câncer causado por exposição a agrotóxicos, como um estudo transversal realizado no Ceará sobre um registro de casos de câncer em trabalhadores rurais, em que revelou risco de câncer de pênis, leucemias e testículos, além de outras localidades em menor frequência, como bexiga, linfomas, tecidos conjuntivos, esôfago e outros (WEICHENTHAL et al., 2012).

No âmbito nacional, um estudo realizado no Paraná, ao comparar homens agricultores com outras populações masculinas também demonstrou dados de mortalidade por cânceres de

estômago, esôfago e laringe (CHRISMAN et al., 2008). Enquanto que no Rio Grande do Sul em um estudo que avaliou a incidência de mortalidade por neoplasias e comparou com dados do Brasil, identificou que os homens morrem mais de câncer do que as mulheres, fato este que se deve a maior exposição ocupacional do homem no trabalho agrícola, neste caso, o que também é percebido em nosso estudo, que demonstrou 97,8% de trabalhadores do sexo masculino (INCA, 2002).

Visto que o câncer resulta do acúmulo de alterações no DNA, que podem ser oriundas de agentes internos e externos, podem culminar na perda de função normal, crescimento e proliferação desordenados. Além disso, os acúmulos de danos no DNA podem ser somados a erros espontâneos de replicação não corrigidos pelo sistema de reparo, podendo causar mutações irreversíveis resultando na progressão de um câncer (KIFMAN; HATAGIMA, 2003). Desta forma, mutações em genes cruciais do mecanismo de reparo, ao estarem mutados, podem levar a modificação na expressão gênica, indicando aumento de atuação dos genes para reparar excesso de danos ou ainda perda de função dos mesmos por já se apresentarem mutados.

Ao avaliarmos a diferença de expressão para os devidos grupos expostos a agrotóxicos observamos associações significativas entre os grupos grande produtor, agricultura familiar e agricultura ecológica para os genes *XPG* e *CSA*, observados na figura 15 e 37, consecutivamente. Ao consideramos os dois grupos expostos aos agrotóxicos como único grupo e ao avaliarmos quanto ao grupo não exposto, também observamos associações significativas para os genes *XPG* e *CSA*, figura 16 e 38, consecutivamente.

Detectamos que os genes de reparo do DNA são, em geral, downregulated em agricultores expostos a pesticidas. Grupo de agricultura industrial apresentou menor expressão de *CSA* and *XPG* em comparação com a agricultura orgânica. É importante notar que *CSA* e *CSB* são a sinalização celular chave de ruptura de DNA de fita simples. Da mesma forma, o *XPG* é um verdadeiro efetor do reparo da classe SSB. Da mesma forma, o grupo de agricultura familiar também apresentou menor *XPG* em comparação com o grupo de agricultura orgânica, o que sugere que a exposição a pesticidas pode ser o principal responsável por esta regulação negativa.

Ao avaliarmos associações do tipo de contato com os agrotóxicos, observamos que o contato direto mostrou associações para os genes *XPA* (figura 28), *XPG* (figura 18) e para o gene *CSB* (figura 32). Agricultores que possuem contato direto, ou seja, de forma mais agressiva, demonstraram diminuição da expressão dos genes. Da mesma forma, ao avaliarmos o tempo de exposição, associações significantes foram encontradas para os genes *XPC* (figura

23), *XPG* (figura 17) e *CSB* (figura 30), também avaliadas com o perfil de expressão diminuídas para tais genes de reparo. É sempre importante lembrar que este é o primeiro trabalho da literatura mundial a demonstrar que genes de reparo do DNA estão “*down regulated*” em agricultores expostos a agrotóxicos.

Desta forma, a regulação negativa dos genes de reparo do DNA também parece depender do tempo em agricultores expostos a pesticidas. Detectamos que os genes de fita simples (*XPC*, *XPG* e *CSB*) apresentaram menor expressão em agricultores expostos a pesticidas há mais de 12 anos do que aqueles que apresentaram menos de 12 anos. O câncer é um processo dependente do tempo e estudos epidemiológicos demonstraram que vários anos de exposição são geralmente necessários para o desenvolvimento do câncer de medula óssea, mas isso também depende do tipo de agente exposto. Jie Jin et al. avaliaram a exposição a pesticidas como um fator de risco para síndromes mielodisplásicas, o câncer de medula óssea mais comum do Mundo Ocidental, em uma meta-análise de onze estudos de casos e controles e detectou um efeito forte, representando um aumento de 63% no risco de desenvolvimento. Características iniciais da SMD (Anemia Refractária (AR) e Anemia Refractária com Sideroblastos em Anel (ARSA) (JIE JIN et al., 2014). Uma avaliação de câncer muito recente em uma população de 70.570 trabalhadores agrícolas do Canadá mostrou que o risco de desenvolver leucemia foi significativamente elevado entre os agricultores, com Agricultores de grua exibindo um aumento de 2 vezes no risco de desenvolver mieloma múltiplo (KACHURI et al., 2017).

Em relação aos hábitos de vida avaliamos o consumo de álcool e o tabagismo por parte dos agricultores que usam agrotóxicos, e mostramos que 54,4% agricultores possuem o hábito de beber, sendo a maioria consumidores de bebida destilada. E quanto ao fumo, embora a maioria não possuem o hábito de fumar, o mesmo é representado por 16 agricultores fumantes, sendo que 12 deles fumam diariamente.

Quanto a tais hábitos mostramos associações importantes. Em relação ao etilismo, os genes que mostraram associações significativas foram o *XPG* (figura 19), *XPC* (figura 24), *CSB* (figura 33) e *CSA* (figura 39). Para o tabagismo os genes que mostraram associações significantes foram o *XPG* (figura 20), *XPC* (figura 25), *XPA* (figura 27) e *CSB* (figura 34). No entanto, diferente dos resultados já discutidos anteriormente, as expressões desses genes para as referidas variáveis mostraram-se com o nível de expressão aumentado.

Assim, detectamos uma maior expressão de genes de rupturas de fita simples em agricultores expostos a pesticidas que fumavam regularmente e / ou bebiam álcool. O álcool e o tabagismo foram consistentemente associados a um aumento na expressão de *CSB*, *XPC* e

*XPG*. Confundir por fator de risco de câncer relacionado ao estilo de vida foi uma preocupação em nosso estudo, mas nós descobrimos que fumar e beber estavam relacionados ao aumento da expressão desses genes contra a regulação negativa entre indivíduos expostos a pesticidas. É importante enfatizar que a magnitude dos efeitos de confusão causados pelo tabagismo e consumo de álcool foi minimizada após uma regressão múltipla, o que não confirmou nenhum efeito significativo na expressão dos genes analisados por este estudo. Não estamos totalmente certo se isso é resultado de eventos compensatórios ou induzidos pelo estresse, mas tanto o tabaco como o tabagismo, bem como outros aspectos relacionados ao estilo de vida, foram associados a mudanças nos padrões de expressão dos genes de reparo do DNA (ZHOU et al., 2013). O álcool crônico e o abuso de tabaco desempenham um papel crucial no desenvolvimento de diferentes distúrbios hepáticos. A ingestão promove a geração de espécies reativas de oxigênio dentro de células hepáticas expondo seu DNA a ciclos contínuos de estresse oxidativo, o que, em última instância, leva a danos irreversíveis no DNA. Em resposta a tais danos, uma maquinaria de reparação de proteção emaranhada compreendendo diferentes proteínas de reparo, como complexos *ATM*, *ATR* e *MRN*, torna-se extremamente ativada, o que é mecanisticamente designado como resposta / consequência, em vez de ação direta pelo agente (BORAN et al., 2017; ALVES et al., 2017; LACAILLE et al., 2016; MANSOORI et al., 2015).

Por fim, nossa análise de expressão frente ao uso de EPI também mostrou associações importantes, no entanto somente para os EPI's máscara e macacão. O uso de macacão mostrou correlações importantes em relação ao gene *XPG* (figura 22) e *CSB* (figura 36). Enquanto que o uso de máscara mostrou associações significantes para todos os genes avaliados nesse estudo, *XPG* (figura 21), *XPC* (figura 26), *XPA* (figura 29), *CSB* (figura 35) e *CSA* (figura 40).

Assim como as análises frente aos hábitos de vida, o uso de EPI's de forma esporádica, ou seja, às vezes ou nunca, mostraram o nível de expressão aumentado para os correspondentes genes. Não podemos designar ao certo os motivos para tais resultados, mas estamos cientes que o mau uso de EPI's pode ser tão ruim ou mais prejudicial que o não uso dos mesmos. Logo, uma possível ação compensatória possa estar agindo e tornando o sistema extremamente ativo (BORAN et al., 2017; ALVES et al., 2017; LACAILLE et al., 2016)

Quanto as correlações avaliadas nesse estudo demonstramos que os genes de reparo de fita simples do DNA avaliados apresentam fortes e moderadas correlações, indicando que um determinado gene influencia a atuação do outro, ou seja, eles são correlacionáveis e participam de uma mesma cascata molecular de eventos. Os genes de reparo de fita simples

atuantes na cascata da via NER participam em conjunto, parte no sensoriamento, como é observado pelos genes *XPC*, na via GG-NER e os genes *CSA* e *CSB* na via TC-NER, eles são responsáveis pela detecção da lesão e recrutamento proteico para que o reparo prossiga (MARTEIJN et al., 2014). Os demais genes, *XPA* e *XPG*, são que traduzem proteínas, são efetores que atuam na excisão da lesão (MARTEIJN et al., 2014). Logo, como já descritos na literatura, os genes de reparo são essenciais para manutenção da estabilidade genética e os dados aqui demonstrados corroboram, por meio dos resultados positivos de correlação, que eles possuem atuação em cascata.

Este estudo apresenta limitações. O número de casos em cada grupo é considerado baixo, o que poderia ter criado associações falsas (erros de tipo I). Uma coleção de amostras em série também teria fornecido mais informações sobre a sazonalidade e permitiu capturar as mudanças longitudinais relevantes associadas a cada participante. Outra limitação do nosso trabalho diz respeito às dificuldades em padronizar os níveis absolutos de exposição e os tipos de controle de agentes para cada participante, o que pode ter diferido significativamente dentro e entre os grupos, mas essa teria sido uma tarefa muito exigente dada a natureza do estudo e a falta da informação disponível. No entanto, deve-se enfatizar que é extremamente desafiante a obtenção de células novas de medula óssea para a cultura e a expressão de RNA dos agricultores expostos à pesticidas, dada a sua localização, acessibilidade e inviabilidade na coleta dessa amostra. Para o nosso melhor conhecimento, este é o primeiro estudo a realizar a análise cromossômica combinada e a expressão de genes de reparação do DNA das células da medula óssea de trabalhadores agrícolas. Não podemos excluir que as associações observadas possam refletir uma multiplicidade de outros fatores, incluindo a predisposição genética. Embora esses resultados sejam interpretados com cautela, uma vez que essas mutações predisponentes também podem funcionar de forma semelhante e encontramos correlações de expressões significativas entre vários genes investigados, acreditamos que as associações detectadas não foram por acaso devido à existência de literatura de apoio associando pesticidas com os danos acumulados nos sistemas de reparação de DNA. Acreditamos que os estudos *in vitro* e os modelos *in vivo* são urgentemente necessários para avaliar ainda mais as prováveis alterações que detectamos, onde uma regulação visível reduzida dos genes de reparo do DNA foi observada em agricultores expostos à pesticidas em comparação com indivíduos de agricultura orgânica que eram demograficamente similares e que compartilhavam a mesma região geográfica.

## 6. CONCLUSÕES

Por meio desse estudo podemos concluir que:

- Esse estudo mostrou resultados satisfatórios que fortalecem e estimulam novas pesquisas que visam demonstrar o prejuízo dos agrotóxicos;
- Mostramos que há alterações nos níveis de expressão de genes de reparo de fita simples em agricultores rurais, genes esses que são cruciais para manutenção da estabilidade genômica;
- Genes de reparo de fita simples do DNA estão “Down Regulated” em agricultores expostos a agrotóxicos.

## REFERÊNCIAS

- ADAD, L. M. M.; ANDRADE, H. H. R.; KVITKO, K.; LEHMANN.; CAVALCANTE, A.A.C.M.; DIHIL, R.R. Occupational exposure of workers to pesticides: Toxicogenetics and susceptibility gene polymorphisms. *Genetics and Molecular Biology*, 2015; 38(3):308-315.
- ALEKSEEV, S.; COIN, F. Orchestral maneuvers at the damaged sites in nucleotide excision repair. *Cell Mol Life Sci*, 2015; 72(11): 2177-2186.
- Ali S, Jain SK, Abdulla M, Athar M. Paraquat induced DNA damage by reactive oxygen species. *Biochem Mol Biol Int*. 1996; 39(1):63-67.
- Alves MG.; Carta CF.; de Barros PP.; Issa JS.; Nunes FD.; Almeida JD. Repair genes expression profile of MLH1, MSH2 and ATM in the normal oral mucosa of chronic smokers. *Archives of Oral Biology*. 2017; 73:60-65.
- ANGRAVE, D.; CHARLWOOD, A.; WOODEN, M. Working time and cigarette smoking: evidence from Australia and the United Kingdom. *Soc Sci Med*, 2014; 112:72-79.
- ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA; UFPR. Seminário Mercado de agrotóxicos e regulação, 2012. Brasília: Anvisa.
- ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA; UFPR. Seminário Mercado de agrotóxicos e regulação, 2015. Brasília: Anvisa.
- AQUINO, S.L.; PEDLOWSKI, M.A.; Agrotóxicos e Reforma Agrária: Uma Análise dos Impactos Socioambientais em Virtude do Uso de Agrotóxicos no Assentamento Zumbi dos Palmares. Apresentado no I Encontro da Rede de Estudos Rurais, 2006.
- 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.
- AUGUSTO, L. G.; GURGEL, L.G.D.; FLORÊNCIO, L.; ARAÚJO, A.C. P. Exposição ocupacional aos agrotóxicos e riscos ambientais: subsídios para ações integradas no estado de Pernambuco. *Pesquisa em saúde ambiental: contexto-complexidade compromisso Social*, 2005; 57-59.
- BALBO, T.; MENG, L.; BLISS, R.L.; JENSEN, J. A.; HATSUKAMI, D.K.; HECHT, S.S. Time course of DNA adduct formation in peripheral blood granulocytes and lymphocytes after drinking alcohol. *Mutagenesis*, 2012; 27(4): 485-490.
- BARAKAT, K.; GAJEWSKI, M.; TUSZYNSKI, J. A. DNA repair inhibitors: the next major step to improve cancer therapy. *Curr Top Med Chem*, 2012; 12(12): 1376-1390.
- BATISTA, M.T.A.; RODRIGUES, H.G.; FONSECA, L.C.; BONETTI, A.M.; SILVA, N.P.; NERES, A.C.; FERREIRA, T.A. Study of the class glycin substituted pesticide on human erythrocytes. *Revista Eletrônica de Farmácia Suplemento*, 2006; 3(2):22-24.

BENATTO, A. Sistemas de informação em saúde nas intoxicações por agrotóxicos e afins no Brasil: situação atual e perspectivas. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

BOCHNER, R. Óbito ocupacional por exposição a agrotóxicos utilizado como evento sentinela: quando pouco significa muito. *Vigil. Sanit*, 2015; 3(4):39-49.

BOLOGNESI, C. CREUS, A.; OSTROSKY, W.; MARCOS, R. Micronuclei and pesticide exposure. *Mutagenesis*, 2011; 26(1): 19-26.

BOLOGNESI, C. Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. *Mutation Research*, 2003; 543:251-272.

Boran C.; Kandirali E.; Yanik S.; Ahsen H.; Ulukaradağ E.; Yilmaz F. Does smoking change expression patterns of the tumor suppressor and DNA repair genes in the prostate gland? *Urol Oncol*. 2017; pii: S1078-1439(17)30101-1.

BOULEY, J.; SAAD, L.; GRALL, R.; SCHELLENBAUER, A.; BIARD, D.; PAGET, V. A new phosphorylated form of Ku70 identified in resistant leukemic cells confers fast but unfaithful DNA repair in cancer cell lines. *Oncotarget*, 2015; 6(29): 7980 – 8000.

Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Sistema de Informações sobre Agrotóxicos (SIA). Disponível em: <http://www4.anvisa.gov.br>. Acesso em 12 de dezembro de 2016.

Braz-Mota S.; Sadauskas-Henrique H.; Duarte R. M.; Val A.L.; Almeida-Val V.M. Roundup® exposure promotes gills and liver impairments, DNA damage and inhibition of brain cholinergic activity in the Amazon teleost fish *Colossoma macropomum*. *Chemosphere*. 2015; 135:53-60.

BUDDEN, T; BOWDEN, N. The Role of Altered Nucleotide Excision Repair and UVN-Induced DNA Damage in Melanomagenesis. *Molecular Sciences*, 2013; 14:1132-1151.

CAMPOS, R.; MIRANDA, R.G. A escrita da história. São Paulo: Escola Educacional, 2005.

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, 2015.

CASTRO, JSM; CONFALONIERI, U. Uso de agrotóxicos no município de Cachoeiras de Macacu (RJ). *Ciência & Saúde Coletiva*, 2005; 10(2): 473-482.

CLAPP R; JACOBS MM; LOECHLER EL. Environmental and Occupational Causes of Cancer. *New Evidence*, 2005-2007.

COGERH. Rede de Monitoramento da qualidade de água operada pela Cogeh, 2002. Disponível em: [http://www.cogerh.com.br/.../Programa\\_de\\_monitoramento\\_da\\_qualidade\\_de\\_agua](http://www.cogerh.com.br/.../Programa_de_monitoramento_da_qualidade_de_agua).

CONCEIÇÃO, M.H. Riscos dos agroquímicos para saúde humana. Ciências da Saúde, Brasília, 2003; 10(1):97.

COX C. Glyphosate. Herbicide Factsheet. Journal of Pesticide Reform, 2004; 24(4): 10-15.

DENNIS K.; JEPPESEN; VILHELM A.; BOHR; TINNA, S. DNA Repair Deficiency in Neurodegeneration, Prog Neurobiol. 2011; 94(2): 166–200.

DIZDAROGLU, M. Oxidatively induced DNA damage and its repair in câncer. Mutation Research, 2014; 763:212-245.

DIZDAROGLU, M; Oxidatively induced DNA damage and its repair in câncer. Mutation Research/Reviews in Mutation Research, 2015; 763:212-245.

ECOBICHON DJ. TOXIC EFFECTS OF PESTICIDES. IN: KLAASSEN CD, EDITOR. Casarett and Doll's toxicology: the basic science of poisons. New York: McGraw-Hill, 2001; 763-810.

ECOPORTAL.NET, 2007. El glifosato provoca las primeras etapas del cancer. 31-03-07. Disponível em: <http://www.ecoport.net/layout/set/print/content/view/full/67941/printversion/1>.

Feng LR.; Kathleen AMZ. Dopamine and paraquat enhance  $\alpha$ -synuclein-induced alterations in membrane conductance. Neurotox Res. 2012; 20(4): 387–401.

FIORI, N.S.; FARIA, N.M.X.; MEUCCI, R.D.; FASSA, A.G. Prevalência e fatores associados ao tabagismo em fumicultores do Sul do Brasil. Cad. Saúde Pública, 2016; 32(7).

FISHEL, R. Mismatch Repair. J. Biol Chem, 2015.

FOUSTERI, M.; MULLENDERS, L.H.F. Transcription-coupled nucleotide excision repair in mammalian cells: molecular mechanisms and biological effects. Cell Reserch, 2008;18:73-84.

FRIEDBERG, E.C.; How nucleotide excision repair protects against câncer. Nature Reviews, 2001.

Hathaichoti S.; Visitnonthachai D.; Ngamsiri P.; Niyomchan A.; Tsogtbayar O.; Wisessaowapak C.; Watcharasit P.; Satayavivad J. Paraquat induces extrinsic pathway of apoptosis in A549 cells by induction of DR5 and repression of anti-apoptotic proteins, DDX3 and GSK3 expression. Toxicology in Vitro. 2017; 42:123-129.

HEALTHSPAN B.; BRENERMAN, M.; JENNIFER L.; DAVID M.; WILSON III. Base excision repair capacity in informing, Carcinogenesis, 2014; 35(12): 2643-2652.

HERMANS, N.; LAFFEBER, C.; CRISTOVÃO, M.; BORAN, M.A.; MARDENBOROUGH, Y.; IKPA, P.; JADDOES, A.; WINTERWERP, H.H.K.; WYMANN, C.; JIRICNY, J.; KANAAR, R.; FRIEDHOLF, P.; LEBBINK, H.G. Dual daughter strand

incision is processive and increases the efficiency of DNA mismatch repair. *Nucleic Acids Research*, 2016.

HOEIJMAKERS, J. H. DNA damage, aging, and cancer. *N. Engl J Med*, 2009; 361(15): 1475-1485.

HOEIJMAKERS, J. H. DNA damage, aging, and cancer. *N. Engl J Med*, 2009; 361(15): 1475-1485.

HUTSELL, S. Q.; SANCAR, A. Nucleotide excision repair, oxidative damage, DNA sequence polymorphisms, and cancer treatment. *Clin Cancer Res*, 2005; 11(4): 155-1357.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios 2001 a 2009. Disponível em: [www.sidra.ibge.gov.br](http://www.sidra.ibge.gov.br)

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). Coordenação de Prevenção e Vigilância. Vigilância do câncer relacionado ao trabalho e ao ambiente/ Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. 2e. rev. atual. – Rio de Janeiro: INCA, 2010.

IPECE. Perfil básico do município de Limoeiro do Norte. Disponível em: [http://www.ipece.ce.gov.br/perfil\\_basico\\_municipal/2016/Limoeiro\\_do\\_Norte](http://www.ipece.ce.gov.br/perfil_basico_municipal/2016/Limoeiro_do_Norte).

IYAMA, T.; WILSON, D. M. DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. *DNA Repair (Amst)*, 2013; 12(8): 620-636.

JIE JIN.; MENGXIA YU.; CHAO HU.; LI YE.; LILI XIE.; JIN JIN.; FEIFEI CHEN.; HONGYAN TONG. Pesticide Exposure as a Risk Factor for Myelodysplastic Syndromes: A Meta-Analysis Based on 1,942 Cases and 5,359 Controls. *Plos One*, 9;1-8.

JOBIM, P.F.C.; NUNES, L.N.; GIUGLIANE, R.; CRUZ, I.B.M. Existe uma associação entre mortalidade por câncer e uso de agrotóxicos? Uma contribuição ao debate. *Ciência e Saúde Coletiva*, 2010; 15(1):277-288.

Kachuri L.; Harris MA.; MacLeod JS.; Tjepkema M.; Peters PA.; Demers PA. Cancer risks in a population-based study of 70.570 agricultural workers: results from the Canadian census health and Environment cohort (CanCHEC). *BMC Cancer*. 2017; 17:343.

KOIFMAN S.; HATAGIMA A. Exposição aos agrotóxicos e câncer ambiental. In F. Peres & JC Moreira (orgs.). *É veneno ou é remédio? Agrotóxicos, saúde e ambiente*. Fiocruz, Rio de Janeiro, 2003; 75-99.

Koller V.J.; Fürhacker M.; Nersesyan A.; Eisenbower M.; Knasmweller S. Cytotoxic and DNA-damaging properties of glyphosate and Roundup in human-derived buccal epithelial cells. *Arch Toxicol*. 2012; 86(5):805-13.

KRAEMER, K. H. et al. Xeroderma pigmentosum, trichothiodystrophy and Cockayne syndrome: a complex genotype-phenotype relationship. *Neuroscience*, 2007; 145(4): 1388-1396.

Lacaille H.; Duterte-Boucher D.; Vaudry H.; Zerdoumi Y.; Flaman JM.; Hashimoto H.; Vaudry D. PACAP Protects the Adolescent and Adult Mice Brain from Ethanol Toxicity and Modulates Distinct Sets of Genes Regulating Similar Networks. *Molecular Neurobiology*. 2016; 1-15.

LANGIE, S. A. Causes of genome instability: the effect of low dose chemical exposures in modern society. *Carcinogenesis*, 2015; 36(1): 61-88.

LEIDE A.; PELAEZ V. Da Revolução Verde à agrobiotecnologia: ruptura ou continuidade de paradigmas? *Revista de Economia – UFPR*, 2007; 33(1).

LIMA, E.P.; LOPES, S.M.B.; AMORIM, M.I.M.; ARAÚJO, L.H.S.; NEVES, K.R.T.; MAIA, E.R. Exposição a pesticidas e repercussão na saúde de agentes sanitaristas no Estado do Ceará, Brasil. *Ciência e Saúde Coletiva*, 2009; 14(6):2221-2230.

LIN, S; XU, S.H.; WANG, H.Q.; CAI, Y.; SONG, M.; WANG, Y.Q.; DU, S.J.; SHI, K.Q.; ZHOU, M.T. Prognostic value of DNA repair based stratification of hepatocellular carcinoma, *Scientific Reports*, 2016.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the  $2^{-(\Delta\Delta C(T))}$  method. *Methods*, 2001; 25:402-408.

Mansoori AA.; Jain SK. Molecular Links between Alcohol and Tobacco Induced DNA Damage, Gene Polymorphisms and Patho-physiological Consequences: A Systematic Review of Hepatic Carcinogenesis. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015; 16 (12), 4803-12.

MARINHO, A.M.C.P.; CARNEIRO, F.F.; ALMEIDA, V. E. Dimensão socioambiental em área de agronegócio: a complexa teia de riscos, incertezas e vulnerabilidades. *Agrotóxicos, trabalho e saúde: vulnerabilidade e resistência no contexto da modernização agrícola no Baixo Jaguaribe/CE*. Fortaleza: Edições UFC, 2011.

MARTEIJN, J.A.; LANS, H.; VERMEUEN, W.; HOEIJMAKERS, J.H.J. Understanding nucleotide excision repair and its roles in câncer and ageing. *Molecular Cell Biology*, 2014.

MATOS G. B.; SANTANA OAM, NOBRE LCC. Intoxicação por agrotóxico. In: BAHIA. Secretaria da Saúde do Estado. Superintendência de Vigilância e Proteção da Saúde. Centro de Estudos da Saúde do Trabalhador. Manual de normas e procedimentos técnicos para a vigilância da saúde do trabalhador. Salvador: CESAT/SESAB, 2002. p.249-280.

MEHTA, A.; HABER, J.E. Sources of DNA double-strand breaks and models of recombinational DNA repair. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol*, 2014; 6(9).

MILHOME, M.A.L.; SOUSA, D.O.B.; LIMA, F.A.F.; NASCIMENTO, R.F. Avaliação do potencial de contaminação de águas superficiais por pesticidas aplicados na agricultura do Baixo Jaguaribe, CE. *Eng. Sanit. Ambient*, 2009; 14(3):363-372.

MILIGI L.; COSTANTINI A.S.; VERALDI A.; BENVENUTI A.; WILL E.; VINEIS P. Cander and pesticides: na overview and some results of the Italian multicenter case-control study on hematolymphopoietic malignancies. *New York Academy of Sciences*, 2006:366-77.  
Moya CA.; Silva MR.; Ramírez CV.; Gallardo DG.; Sánchez RL.; Aguirre AC.; Velasco AF. Comparison of the in vivo and in vitro genotoxicity of glyphosate isopropylamine salt in three different organisms. *Genet. Mol. Biol.* 2014; 37(1):105-110.

NATALE, V. A comprehensive description of the severity groups in Cockayne syndrome. *Am J Med Genet*, 2011; 155(5): 1081-1095.

OZTURK, S.; DEMIR, N. DNA repair mechanisms in mammalian germ cells. *Histol Histopathol*, 2011; 26(4): 505-517.

OZTURK, S.; DEMIR, N. DNA repair mechanisms in mammalian germ cells. *Histol Histopathol*, 2011; 26(4): 505-517.

PAIVA, J.C.G.; CABRAL, I. O.; SOARES, B. M.; SOMBRA, C.M.L.; FERREIRA, J.R.O.; MORAES, M.O.; CAVALCANTI, B. C.; PESSOA, C. Biomonitoring of rural workers exposed to a complex mixture of pesticides in the Municipalities of Tianguá and Ubajara (Ceará State, Brazil): Genotoxic and Cytogenetic studies. *Environmental and molecular mutagenesis*, 2011; 52:492-501.

PERERA, D.; POULOS, R. C.; SHAH, A.; PIMANDA, J. E.; WONG, J.W.H. Differential DNA repair underlies mutation hotspots at active promoters in câncer genomes. *Research Letter*, 2016.

PETRUSEVA, O.; EVDOKIMOV, A.N.; LAVRIK, O.I. Molecular Mechanis of Global Genome Nucleotide Excision Repair. *Acta Naturae*, 2014.

PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.*, 2001; 29(9):E45.

PFAFFL, M.W.; TICHOPAD, A.; PRGOMET, C.; NEUVIANS, T.P. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett.*,2004; 26(6): 509-515.

REMOR, A. P.; TOTTI, C.C.; MOREIRA, D.A.; DUTRA, G.P.; HEUSER, V.D.; BOEIRA, J. M. Occupational exposure of farm workers to pesticides: Biochemical parameters and evaluation of genotoxicity. *Environment International*, 2009; 35:273-278.

RIBEIRO HL JUNIOR; DE OLIVEIRA, R.T.; MAIA, A.R.; PIRES FERREIRA FILHO, L.I.; DE SOUSA, J.C., HEREDIA, F.F.; MAGALHÃES, S.M.; PINHEIRO, R.F. Polymorphisms of DNA repair genes are related to the pathogenesis of myelodysplastic syndrome. *Hematol Oncol*, 2015; 33(4): 220-228.

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. Genética do Câncer humano. *Mutagênese ambiental. Canoas: Ed. ULBRA*, 2003; 29-48.

RICHMAN, S. Deficient mismatch repair: Read all about it (Review). *Int J Oncol*, 2015.

RIGOTO, M. R.; SILVA, C.M.A.; FERREIRA, M.J.M.; ROSA, F.I.; AGUIAR, P.C.A. Tendências de agravos crônicos à saúde associados a agrotóxicos em região de fruticultura no Ceará, Brasil. *Ver. Bras. Epidemiol*, 2013; 16(3):763-773.

RIGOTTO R. M. 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, R.M.; MARINHO, A.M.C.P.; ELLERY, A.E.L.; SAMPAIO, J.L.F.; TUPINAMBA, S.U. Da primavera silenciosa as primaveras silenciadas: conflitos socioambientais no agronegócio da fruticultura e agrotóxicos no Baixo Jaguaribe – CE. In: Seminário Nacional sobre desenvolvimento e conflitos ambientais, 2008.

RODVALL Y; DICH J.; WIKLUND K. Cancer risk in offspring of male pesticide applicators in agriculture in Sweden. *Occup Environ Med*, 2003; 798-801.

ROUILLON, C.; WHITE, M. F. The evolution and mechanisms of nucleotide excision repair proteins. *Res Microbiol*, 2011; 162(1): 19-26.

SAIJO, M. The role of Cockayne syndrome group A (CSA) protein in transcription-coupled nucleotide excision repair. *Mechanisms of Ageing Development*, 2013; 134:196-201.

SAILAJA, N.; CHANDRASEKHAR, M.; REKHADEVI, P.V.; MAHBOOB, M.; RAHMAN, F.M.; SALEHA, B.V.; DANADEVI, K.; HUSSAIN, S.A.; GROVER, P. Genotoxi evaluation of workers employed in pesticide production. *Mutation Research*, 2006, 74-80.

SCHARER, O. D. Nucleotide Excision Repair in Eukaryotes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2013.

SCHÄRER, O. D. Nucleotide excision repair in eukaryotes. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2013; 5(10).

SCHMIDT, MLG; GODINHO, PH. Um breve estudo acerca do cotidiano do trabalho de produtores rurais: intoxicações por agrotóxicos e subnotificação. *Revista Brasileira de Saúde Ocupacional*, 2006; 31(113):27-40.

SCHMITTGEN, T.D.; LIVAK, K.J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc.*, 2008; 3(6): 1101-1108.

SILVA, J.M.; NOVATO-SILVA, E.; FARIA, H.P.; PINHEIRO, T.M.N. Agrotóxicos e trabalho: uma combinação perigosa para a saúde do trabalhador rural. *Ciências e Saúde Coletiva*, Rio de Janeiro, 2004; 10(4):891-903.

SILVA, J.M.; SILVA, E.N.; FARIA, H.P.; PINHEIRO, T.M.M. Agrotóxico e trabalho: uma combinação perigosa para a saúde do trabalhador rural. *Ciência e Saúde Coletiva*, 2005; 10(4):891-903.

SINITOX – SISTEMA NACIONAL DE INFORMAÇÕES TÓXICO FARMACOLÓGICAS. Óbitos registrados de intoxicação humana por agente tóxico e circunstância. Brasil, 2009. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/sinitox>

SO, E.Y.; OUCHI, T. Decreased DNA repair activity in boné marrow due to low expression. Of DNA damage repair proteins. *Cancer Biology e Therapy*, 2014, 15(7):906-910.

SORJ, B. Estado e classes sociais na agricultura brasileira. rev. Rio de Janeiro: Centro Edelstein de Pesquisas Sociais, 2008.

SPRY, M.; SCOTT, T.; PIERCE, H.; ORAZIO, J.A. DNA repair pathways and hereditary câncer susceptibility syndromes. *Frontiers in Bioscience*, 2007; 12:4191-4207.

STERN, M.; LIN, J.; FIGUEROA, J. D.; KELSEY, K. T.; KILTIE, A. E. et al. Polymorphisms in DNA repair genes, smoking, and bladder cancer risk: findings from the International Consortium of Bladder Cancer. *Cancer Res.*, 2009; 69(17): 6857–6864.

TESTINO, M. D. The Burden of Cancer Attributable to Alcohol Consumption Gianni. *A Journal of Clinical Medicine*, 2011; 6(4).

THUNDIYIL, T.G.; STOBBER, J.; BEBSBELL, N; PONCZUK, J. Acute Pesticide poisoning: a proposed classification a toll. *Bull. World Health Origen*, 2008; 86:205-209.

TORGASHEVA, N.A.; MENZOROVA, N.I.; SIBIRTSEV, Y.T.; RASSKAZOV, V.A.; ZHARKOV, D.O.; NEVINSKY, G.A. Base excision DNA repair in the embryonic development of the sea urchin, *Strongylocentrotus intermedius*. Royal, Society of Chemistry, 2016.

Townsend M.; Peck C.; Meng W.; Heaton M.; Robison R.; O'Neill, K. Evaluation of various glyphosate concentrations on DNA damage in human Raji cells and its impact on cytotoxicity. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2017; 85:79-85.

VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.*, 2002; 3(7).

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.

WAICHMAN, A.V. A problemática do uso de agrotóxicos no Brasil: a necessidade de construção de uma visão compartilhada por todos os atores sociais. *Revista Brasileira de Saúde Ocupacional*, 2012; 37(125): 42-47.

WEICHENTHAL, S.; MOASE, C.; CHAN, P. A Review of Pesticide Exposure and Cancer incidence in the agricultural health study Cohort. *Cien. Saúde Colet.*, 2012; 17(1): 255-270.

WILSON, D. M. et al. Variation in base excision repair capacity. *Mutat Res*, 2011; 1(2): 100-112.

WOODRUFF, TJ; ZOTA, AR; SCHWARTZ, JM. Environmental chemicals in pregnant women in the United States: NHANES 20032004. *Environmental Health Perspectives*, 2011; 119 (6):878-885.

Zhou W.; Liu G.; Miller DP.; Xu LL.; Wain JC.; Lynch TJ.; Su L.; Christiani DC. Polymorphisms in the DNA repair genes XRCC1 and ERCC@, smoking, and lung câncer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers*. 2003; 12(4):359-65.



## APÊNDICE A

### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

#### Universidade Federal do Ceará/UFC

**Introdução:** Estamos desenvolvendo uma pesquisa intitulada **Análise de expressão dos genes de reparo da lesão de fita simples do DNA de trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos, 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.	<b>Quantos anos</b> Limoeiro do Norte 1 Quixeré 2 Russas 3 Outra 4 ( _____ ) 99 Não respondeu	

#### PARTE 2 - HÁBITOS DE VIDA

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

**PARTE 4 - CARACTERIZAÇÃO DO TRABALHO**

401	Quantos anos de trabalho na agricultura você tem?	( _____ )	Menos de 01 ano De 01 a 04 anos De 05 a 08 anos De 08 a 12 anos Mais de 12 anos Não sei Não respondeu	1 2 3 4 5 88 99	→403
402	Qual a sua atividade de trabalho, antes de trabalhar na agricultura?	( _____ )	Estudante Autônomo Pedreiro Eletricista Comerciário Agricultor Outros 99 Não respondeu	1 2 3 4 5 6 7 99	
405	Em qual setor da empresa você trabalha?	( _____ )	Administração Setor de Química/preparação Aplicação de químicos Plantio Preparação de mudas Setor de colheitas Setor de embalagem Restaurante Outro 99 Não respondeu	1 2 3 4 5 6 7 8 9 99	
406	Qual a função que você exerce em seu trabalho?	( _____ )	Administrador Engenheiro Advogado Técnico Agrícola Técnico de Laboratório Técnico de segurança do Trabalho Vigilante Preparador de Produtos químicos Aplicador de Agrotóxicos Preparador de mudas Plantador Irigadores Adubação Desbaste Eliminação de pencas ou falsa penca Eliminação do coração Limpeza do cacho Escoramento das bananeiras Desvio do cacho ou do "filho" Rebaixamento do pseudocaule (tronco) Embolsamento de cachos Marcador de cacho Rebaixador inicial Rebaixador final Desfolha Colhedor de frutas Pós-colheita Tratorista Cozinheiro	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 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 Não Não sei Não respondeu	1 2 88 99	→601 →601 →601
504	Qual é o tipo de contato que você tem com esses agrotóxicos (veneno)?	Direto (durante a atividade de trabalho) Indireto (após aplicação, colheita, muda e outros) Durante a pulverização aérea Não sei Não respondeu	1 2 3 88 99	
505	Em qual (ais) atividade(s) de trabalho você tem contato com agrotóxicos (veneno)?	Preparação de misturas Pulverização costal Pulverização aérea Armazenamento Descarte de embalagem Limpeza de roupa Limpeza do equipamento Gotejamento contínuo Transporte Trabalho em área pulverizada Embalagem do produto final Outros ( _____ ) Não sei Não respondeu	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 88 99	
506	Nos períodos de pulverização aérea, o seu contato com o veneno acontece:	Durante a pulverização, pois você permanece em sua função Você ajuda a sinalizar para o avião com bandeira Você entra no bananal logo após a pulverização Você mora perto das áreas pulverizadas Não sei Não respondeu	1 2 3 4 88 99	
508	Quais são os agrotóxicos (veneno) que você tem contato?  OBS: os que estão grifados são herbicidas	Bayfidan EC Bórax Bravonil 500 <u>Carbofuran</u> Cercobin 500SC Cobre Atar BR Comet Cuprozeb Domark 100EC <u>Finale</u> Flare Folicur 200 CE Fugiscan 700WP Garant <u>Gramocil</u> <u>Gramoxone 200</u> Icarus Impact 125SC Juno 250CE Manzate 800 Metiltiofan Mythos Nativo Opera Opus SC Orius 250EC <u>Roundup</u> Score <u>Scout NA</u> Soprano 125SC Soprano 25 EC Stratego 250 EC Sulfato de cobre Support Tango Cash Tecto SC Tilt Triade	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38	

		Triazol Virtue Outros ( Não sei Não respondeu	39 40 41 88 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) Outro (_____)	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 ADOTADOS 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 Banho após o trabalho Nenhuma proteção	1 1 1	2 2 2	3 3 3	88 88 88	99 99 99	
614	Onde são lavados os EPIs que você usa no trabalho?			Em casa Na empresa Não respondeu	1 2 99	→615	
615	Onde são lavadas as roupas que você usa no trabalho?			Em casa Na empresa Não respondeu	1 2 99	→616 →617	
616	As roupas usadas durante o trabalho com uso de agrotóxicos são lavadas separadamente das roupas da família?				Sim Não Não respondeu	1 2 99	

617	O que é feito com as embalagens vazias dos produtos químicos (Agrotóxicos) usados na empresa em que você trabalha?	Queima	1
		Enterra	2
		Reutiliza	3
		Armazena	4
		Devolve ao vendedor	5
		Vai para Unidade de Tratamento de Embalagens (UTE)	6
		Não sei	88
Não respondeu	99		

**PARTE 9 – HISTÓRIA CLÍNICA DO TRABALHADOR**

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

Entrevistador:

---

Obrigado por ter participado