



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

IZABELLE ROCHA FARIAS

**ANALISE DA EXPRESSÃO DOS GENES DE REPARO DA LESÃO DE FITA DUPLA
DO DNA DE TRABALHADORES RURAIS EXPOSTOS A AGROTÓXICOS.**

FORTALEZA – CEARÁ

2017

IZABELLE ROCHA FARIAS

**ANALISE DA EXPRESSÃO DOS GENES DE REPARO DA LESÃO DE FITA DUPLA
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)

F238a Farias, Isabelle Rocha.
ANALISE DA EXPRESSÃO DOS GENES DE REPARO DA LESÃO DE FITA DUPLA DO DNA
DE TRABALHADORES RURAIS EXPOSTOS A AGROTÓXICOS. / Isabelle Rocha Farias. – 2017.
101 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. Lesão no DNA. 3. Fita Dupla. 4. Mecanismo de Reparo. 5. Expressão gênica. I. Título.
CDD 610

IZABELLE ROCHA FARIAS

**ANALISE DA EXPRESSÃO DOS GENES DE REPARO DA LESÃO DE FITA DUPLA
DO DNA DE TRABALHADORES RURAIS EXPOSTOS A AGROTÓXICOS.**

Defesa em: 17 / 02/ 2017.

BANCA EXAMINADORA

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

Dr. Howard Lopes Ribeiro Junior
Universidade Federal do Ceará

Dr. Marcelo José Monteiro Ferreira
Universidade Federal do Ceará

Dra. Vanira Matos Pessoa
Fundação Oswaldo Cruz

FORTALEZA

2017

*À Deus.
Aos meus pais, irmã e namorado.
Ao Grego (meu cachorrinho).
Com amor e admiração.*

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, primeiramente, por me amparar e fortalecer em todos os momentos de minha vida.

Aos meus pais **Antônio de Mesquita Farias** e **Maria da Conceição Rocha Farias** e a minha irmã **Samara Rocha Farias**, que tanto se dedicaram e se dedicam a minha formação. Por serem minha força e meu porto seguro em todos os momentos. Muito obrigada por todo o amor incondicional, pela paciência e exemplos diários. Amo vocês demais!

Ao meu amado namorado **Raul Alber Ribeiro Portela** pelo companheirismo, pelos cuidados de todos os dias, pela paciência nas ausências, enfim por simplesmente se fazer presente em todos os momentos. Sem esquecer também do nosso querido cachorrinho **Grego** por todas as noites acordadas comigo sempre que tenho que estudar.

Ao **Prof. Dr. Ronald Feitosa Pinheiro**, meu orientador, pelos mais de cinco anos de ensinamentos, pelas cobranças, pelos exemplos de trabalho e seriedade diários, pela presença e tempo dedicados para concretização deste estudo onde cada passo foi fundamental para o meu crescimento profissional e aprendizado. Obrigada, que Deus lhe abençoe e que o Sr. tenha muito sucesso em sua carreira.

Ao **Dr. Howard Lopes Ribeiro Junior**, por aceitar participar da minha banca de qualificação e defesa de dissertação, dividindo seus conhecimentos comigo nesse estudo e engrandecendo meu aprendizado.

À **Dra. Fabíola Fernandes Heredia**, por aceitar participar da banca de qualificação dessa dissertação, propondo diversas sugestões que muito enriqueceram este trabalho.

Ao **Dr. Marcelo José Monteiro Ferreira**, por aceitar participar da banca de defesa de mestrado dessa dissertação, contribuindo assim para as discussões dos resultados obtidos neste trabalho.

À **Dra. Vanira Matos Pessoa**, por também prontamente aceitar contribuir e participar da banca de defesa desta dissertação, possibilitando assim uma melhor compreensão do estudo com sua vivência científica e melhorando meus resultados.

À todos do **Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas**, em especial a **Ivone e a Rita**, por sempre nos ajudarem com as dúvidas, problemas, prazos, editais e em diversas outras questões. Muito obrigada por toda a disponibilidade e paciência.

À **Juliana Cordeiro de Sousa**, por todos os anos de ensinamentos e por sempre está atenta a todas as minhas inquietações. Obrigada pela paciência, pelo modelo de profissional, sou eternamente grata pelos seus conselhos, foram muito bem recebidos. Sucesso!!!

Às minhas amigas, **Marília Braga Costa (Mah)** e **Daniela de Paula Borges (Dani)**, por serem as pessoas com quem eu compartilho os meus medos, as dificuldades, as novas ideias, as lágrimas, os sorrisos, enfim por toda a carga que sozinha eu não teria suportado. Obrigada por estarem comigo, por sempre dividirmos as mil e uma coisas que temos para fazer, sejam elas acadêmicas ou não, por três.

Por fim, a todos os membros do **Laboratório de Citogenômica do Câncer**, todos muito especiais, **Roberta Taiane, Mayara Magna, Manuela Couto, Kézia Nobrega, Rinna Arruda, Bruna de Araújo, Mayumi Ito, Antônio Wesley, Gabrielle Melo, Gabriel Frota, Bruna Vitoriano, Emanna Lima, Cínthya, Luiz Ivando, Germana e Anácia** por estarem comigo diariamente fazendo do nosso trabalho pesado um fardo bem mais leve. Adoro todas as brincadeiras, comentários, piadas, jargões, enfim a nova formação não poderia ser melhor.

*“Quanto mais a alma confiar, tanto mais receberá”
(Diário de Santa Faustina, pág. 1577)*

RESUMO

A necessidade do aumento na demanda de alimentos produzidos trouxe consigo a incorporação do desenvolvimento técnico-científico à agricultura e passou a ser justificativa para a utilização de alguns produtos químicos com o objetivo de obter uma maior produção por meio da manipulação de fatores orgânicos. Os danos que são acarretados devido aos níveis elevados de toxicidade dos agrotóxicos vem sendo uma das maiores causas de cânceres em agricultores, tornando-se de extrema relevância os estudos nos mecanismos de ação envolvidos e os danos que podem vir a causar à saúde humana. Afim de manter a integridade genômica e sua estabilidade os seres humanos possuem em torno de 150 genes envolvidos diretamente nos mecanismos de reparo de DNA. Estes danos quando acometem a dupla fita de DNA (DSBs) podem ser corrigidos por dois tipos de mecanismo, a Recombinação Homóloga (HR) e a Junção de Extremidades Não Homólogas (NHEJ). Problemas nos mecanismos de reparo de dupla fita de DNA como resposta a diversos tipos de danos acarretados pela exposição a agrotóxicos por agricultores pode desencadear o acúmulo de alterações genéticas e/ou a desregulação do crescimento celular, levando à instabilidade genômica e desenvolvimento neoplásico. Portanto, o presente estudo tem por objetivo analisar as alterações genéticas, por citogenética clássica por bandeamento G, e a expressão genica, por meio da técnica de PCR em tempo real, dos genes *ATM*, *BRCA1*, *BRCA2*, *XRCC5*, *XRCC6*, *RAD51* e *LIG4*, pertencentes ao mecanismo de reparo de fita dupla do DNA. Essa análise baseou-se em 90 casos de trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos da região da Chapada do Apodi, em Limoeiro do Norte, e 10 amostras de indivíduos saudáveis como controle. Com esse estudo, foi possível identificar que: os genes *ATM*, *LIG4* e *XRCC5* apresentaram o nível de expressão significativo para a variável tempo de exposição aos agrotóxicos e para a variável grupos de agricultores, os genes *LIG4*, *XRCC5* e *XRCC6* apresentaram o nível de expressão significativa para as variáveis fumo e álcool; os níveis de expressão dos genes *XRCC5* e *XRCC6* foram ainda significativos para a variável uso de EPIs; o gene *BRCA2* apresentou significância de expressão para a variável cariótipo, por fim, o gene *XRCC6* apresentou nível de expressão significativo para a variável tipo de contato com agrotóxico. Estes resultados suportam a importância dos genes *ATM*, *BRCA1*, *BRCA2*, *XRCC5*, *XRCC6* e *LIG4* na manutenção da estabilidade genômica promovendo um melhor entendimento dos mecanismos celulares influenciados pela exposição a agrotóxicos.

Palavras Chave: Agrotóxicos, Lesão no DNA. Fita Dupla. Mecanismo de Reparo. Expressão gênica.

ABSTRACT

The need to increase the demand for food produced brought with it an incorporation of technical-scientific development in agriculture and became a justification for the use of some chemicals in order to obtain a higher production through the manipulation of organic factors. The damage caused by high levels of toxicity of pesticides in a greater number of cases of cancers in farmers, making studies of the mechanisms of action involved and the damages that can cause human health of extreme relevance. In order to maintain a genomic integrity and its human stability around 150 genes involved in our DNA repair mechanisms. These errors when a DNA tape (DSBs) can be corrected by two types of mechanism, a Homologous Recombination (HR) and a Joint of Non-Homologous Extremities (NHEJ). Problems in DNA tape repair mechanisms in response to various types of damage caused by exposure to agrochemicals by farmers may trigger the accumulation of genetic genes and / or a deregulation of cell growth, leading to genomic instability and neoplastic development. The aim of the present study was to analyze genetic genetics by genetic cytogenetics by gene expression using the real-time PCR technique using *ATM*, *BRCA1*, *BRCA2*, *XRCC5*, *XRCC6*, *RAD51* and *LIG4* genes, belonging to the double-stranded DNA repair mechanism. This analysis was based on 90 cases of rural workers exposed to pesticides in the region of the Chapada do Apodi, in Limoeiro do Norte, and 10 samples from healthy individuals as control. With this study, it was possible to identify the *ATM*, *LIG4* and *XRCC5* genes presented the level of expression significant for a time variable of exposure to agrochemicals and for a variable groups of farmers, the genes *LIG4*, *XRCC5* and *XRCC6* presented the level of expression Para as variables Smoke and alcohol levels; expression levels of the *XRCC5* and *XRCC6* genes were still significant for a variable use of EPIs; the *BRCA2* gene presented significance of expression for a variable karyotype; finally, gene *XRCC6* a variable type of contact with pesticide. These results support the importance of *ATM*, *BRCA1*, *BRCA2*, *XRCC5*, *XRCC6* and *LIG4* genes in the maintenance of genomic stability, promoting a better understanding of the cellular mechanisms influenced by exposure to pesticides.

Key-Words: Agrotoxic. Lesion in DNA. Double Strand. Repair Mechanismo. Gene expression.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Produção Agrícola e o consumo de agrotóxicos e fertilizantes químicos nas lavouras do Brasil, de 2002 a 2011.	Erro! Indicador não definido.
Figura 2: Mapa da localização no Estado do Ceará das comunidades da Chapada do Apodi, de forma específica os municípios de Limoeiro do Norte e Quixeré alvos do estudo.	19
Figura 3: Caminhos das substâncias tóxicas no organismo, absorção ¹ , distribuição ² e eliminação ³ .	24
Figura 4: Processo detalhado da carcinogênese	25
Figura 5: Esquema representativo da ação de fatores mutagênicos (externos e internos) causando a quebra da dupla fita da molécula de DNA.	27
Figura 6: Descrição do comportamento celular quando a molécula de DNA é acometida por danos.	28
Figura 7: Cascata de sinalização proteica do ciclo celular e suas doenças correspondentes de acordo com os alvos moleculares afetados por fatores carcinogênicos.	30
Figura 8: Apresentação esquemática das proteínas atuantes na ativação do sensoriamento molecular da proteína <i>ATM</i> e <i>ATR</i> .	31
Figura 9: Apresentação esquemática das proteínas atuantes nos mecanismos de reparo por recombinação homóloga em danos de fita dupla no DNA (DSBs).	33
Figura 10: Apresentação esquemática das proteínas atuantes nos mecanismos de reparo de Junções por extremidades não homólogas (NHEJ) em danos de fita dupla no DNA. (DSBs).	35
Figura 11: Organograma resumo das metodologias utilizadas neste estudo	37
Figura 12: Esquema detalhado dos procedimentos quem compõem a técnica de Citogenética Clássica por Bandeamento G.	40
Figura 13: Representação esquemática dos resultados citogenéticos a partir de amostras de medula óssea de trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos.	52
Figura 14: Nível de expressão do gene <i>ATM</i> em relação ao tempo de trabalho em contato com agrotóxico dos trabalhadores rurais.	53
Figura 15: Nível de expressão do gene <i>ATM</i> em relação variável grupo de agricultores, categorizada em grande produtor, pequeno produtor e agricultura ecológica.	54
Figura 16: Nível de expressão do gene <i>ATM</i> em relação variável tempo de trabalho na agricultura.	55

Figura 17: Nível de expressão do gene BRCA1 em relação variável sexo dos trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos.	56
Figura 18: Nível de expressão do gene BRCA2 em relação variável resultado de cariótipo.	57
Figura 19: Nível de expressão do gene BRCA2 em relação variável local aonde são lavadas as roupas dos trabalhadores rurais.	58
Figura 20: Nível de expressão do gene XRCC5 em relação variável consumo de álcool.	59
Figura 21: Nível de expressão do gene XRCC5 em relação variável uso de macacão (EPIs).	60
Figura 22: Nível de expressão do gene XRCC5 em relação variável grupos de trabalhadores rurais.	61
Figura 23: Nível de expressão do gene XRCC5 em relação variável tempo de uso de agrotóxico na agricultura familiar.	62
Figura 24: Nível de expressão do gene XRCC6 em relação as variáveis consumo de álcool e tipo de contato do trabalhador com agrotóxico.	63
Figura 25: Nível de expressão do gene XRCC6 em relação ao tipo de contato do trabalhador com o agrotóxico.	64
Figura 26: Nível de expressão do gene XRCC6 em relação variável uso de máscara.	65
Figura 27: Nível de expressão do gene LIG4 em relação a variável uso de agricultores dentre os grupos e a variável fumo.	66
Figura 28: Nível de expressão do gene LIG4 em relação a variável consumo de álcool.	67
Figura 29: Nível de expressão do gene LIG4 em relação a variável consumo de álcool.	68
Figura 30: Nível de expressão do gene LIG4 em relação aos grupos de trabalhadores.	69
Figura 31: Nível de expressão do gene LIG4 em relação ao tempo de uso de agrotóxico na agricultura familiar.	70
Figura 32: Representação esquemática dos resultados de expressão gênica deste estudo.	71
Figura 33: Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes BRCA1 e RAD51 de trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos.	73
Figura 34: Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes BRCA1 e XRCC5 de trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos.	73
Figura 35: Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes ATM e XRCC5 de trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos.	74
Figura 36: Análise de níveis de expressão dos genes ATM e LIG4 de trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos.	Erro! Indicador não definido. 75
Figura 37: Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes BRCA1 e BRCA2 de trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos.	76

Figura 38: Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes BRCA1 e XRCC6 de trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos.	76
Figura 39: Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes BRCA1 e LIG4 de trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos.	76
Figura 40: Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes XRCC5 e LIG4 de trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos.	77
Figura 41: Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes BRCA2 e RAD51 de trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos.	78
Figura 42: Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes XRCC5 e XRCC6 de trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos.	Erro! Indicador não definido. 79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação dos principais grupos químicos que compõem as classes de agrotóxicos mais utilizados no agronegócio.	22
Tabela 2: Relação entre os tipos de exposição a agrotóxicos e os sinais e sintomas clínicos presentes.	25
Tabela 3: Genes avaliados por qPCR envolvidos nos mecanismos de reparo em DSBs no DNA.	42
Tabela 4: Caracterização descritiva das variáveis sócio demográficas dos trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos (DSBs).	46
Tabela 5: Caracterização descritiva dos hábitos de vida dos trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos.	47
Tabela 6: Caracterização descritiva da exposição dos trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos.	48
Tabela 7: Medidas de controle de risco adotados pelos trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos.	49
Tabela 8: Caracterização dos cariótipos de acordo com os grupos de trabalhadores rurais.	50
Tabela 9: Descrição detalhada dos resultados citogenéticos normais e alterados por cada grupo de trabalhador rural.	51

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTB	<i>Actin Beta</i>
ATM	<i>Ataxia Telangiectasia Mutada</i>
ATR	<i>Ataxia Telangiectasia Mutada dependente de RAD</i>
BER	<i>Base Excision Repair</i>
BRCA1	<i>Breast cancer Type I</i>
BRCA2	<i>Breast cancer Type II</i>
cDNA	<i>DNA Complementar</i>
Cq	<i>Quantitative Cycle</i>
DEPC	<i>Diethylpirocarbonate</i>
DL-50	<i>Dose Letal Média</i>
DNA	<i>Ácido Desoxirribonucleico</i>
DNA LIG4	<i>DNA Ligase tipo IV</i>
DNAPK	<i>DNA - dependente proteína quinase</i>
DSB	<i>Double Strand-Break</i>
EPI	<i>Equipamentos de Proteção Individual</i>
FAO	<i>Organização Mundial das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação</i>
HPRT1	<i>Hypoxanthine Phosphoribosyl Transferase</i>
HR	<i>Homologous Recombination</i>
IAs	<i>Ingredientes Ativos</i>
KCl	<i>Cloreto de Potássio</i>
MIQE	<i>Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR</i>

Experiments

MRE11	<i>Meiotic Recombination 11</i>
MgCl	<i>Cloreto de Magnésio</i>
MMA	<i>Ministério do Meio Ambiente</i>
MMR	<i>Mismatch Repair</i>
MO	<i>Medula Óssea</i>
MPS1	<i>Monopolar spindle 1</i>
MS	<i>Ministério da Saúde</i>
NER	<i>Nucleotide Excision Repair</i>
NHEJ	<i>Non-Homologous End-Join</i>
NR-06	<i>Norma Reguladora</i>
OMS	<i>Organização Mundial da Saúde</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PCSS	<i>Premature chromatid separation syndrome</i>
r^2	<i>r-square</i>
RAD51	<i>Radiation-Sensitive Yeast Mutations</i>
RB	<i>Retinoblastoma protein family members</i>
RNA	<i>Ácido ribonucleico</i>
RPM	<i>Rotações por minuto</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
SD	<i>Desvio Padrão</i>
TP53	<i>Tumor protein 53</i>

UV	Luz Ultravioleta
UBC	<i>Ubiquitin C</i>
XRCC5	<i>X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 5</i>
XRCC6	<i>X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 6</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1. Dimensão Histórica e o Uso de Agrotóxicos na Agricultura	16
1.2. A Agricultura no Âmbito Nacional	17
1.3. Implicações no Uso de Agrotóxico	21
1.4. Câncer e os Efeitos Carcinogênicos dos Agrotóxicos	25
1.5. Lesão ao DNA	28
1.5.1. Ciclo celular e o Sensoriamento de Lesões no DNA	29
1.6. Mecanismos de Reparo do DNA	31
1.6.1. Mecanismos de Reparo de Lesões de Fita Dupla no DNA (DSB)	32
2. OBJETIVO	36
2.1. OBJETIVO GERAL	36
2.2. OBJETIVO ESPECÍFICO	36
3. MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1. Aspectos Éticos	37
3.2. COLETA DE DADOS E OBTENÇÃO DE AMOSTRAS	38
3.3. Cariótipo por Bandeamento G	39
3.4. Lise de Células Eritrocitárias para Armazenamento em TRIZOL LS A -8°C	40
3.5. Análise da Expressão do mRNA por QRT-PCR	41
3.5.1. Extração de RNA Total	41
3.5.2. Síntese de cDNA	41
3.5.3. Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) em Tempo Real – PCR Quantitativa (QPCR) para Análise de Expressão Gênica	42
3.5.4. Validação dos Genes Endógenos Utilizados nas Análises dos Dados de qPCR	44
3.5.5. Validação da Qualidade, Integridade e Estabilidade do Nível de Expressão das Amostras de cDNA dos Trabalhadores Avaliados	44
3.6. Análise Estatística	44
3.6.1. Análises Estatísticas para a Avaliação dos Dados de Expressão Gênica	44
4. RESULTADOS	46
4.1. Caracterização da População	46

4.2.	Análise do nível de expressão gênica por QPCR em amostras de <i>pool</i> celular da medula de agricultores expostos a agrotóxicos	53
4.2.1.	Análise dos níveis de expressão do gene <i>ATM</i>	53
4.2.2.	Análise dos níveis de expressão do gene <i>BRCA1</i>	56
4.2.3.	Análise dos níveis de expressão do gene <i>BRCA2</i>	57
4.2.4.	Análise dos níveis de expressão do gene <i>XRCC5</i>	59
4.2.5.	Análise dos níveis de expressão do gene <i>XRCC6</i>	63
4.2.6.	Análise dos níveis de expressão do gene <i>LIG4</i>	66
4.2.7.	Análise dos níveis de expressão do gene <i>RAD51</i> .	70
4.3.	Análises de correlação entre os níveis de expressão dos genes relacionados aos mecanismos de reparo em danos de fita dupla do DNA	72
5.	DISCUSSÃO	80
6.	CONCLUSÃO	86
7.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86
	APÊNDICE A	92
	APÊNDICE B	93

1. INTRODUÇÃO

1.1. Dimensão Histórica e o Uso de Agrotóxicos na Agricultura

O desenvolvimento da humanidade sempre esteve ligado a obtenção de alimentos (PEDLOWSKI et al., 2007). Dessa forma, o processo de transição entre a obtenção de alimentos por meio da caça e coleta para a agricultura acarretou significativas mudanças que resultaram em diversas transformações, período esse conhecido como “Revolução Agrícola”. Esse processo estabeleceu uma nova relação entre homem e natureza de forma gradual, dando-lhes a capacidade de produzir seu próprio alimento, de domesticar plantas e animais, além de influenciar no abandono da vida nômade (CAMPOS; MIRANDA, 2005).

A evolução social para o modelo agrícola exigia agora novas formas para se explorar o ambiente, os hábitos de vida decorrente da organização nas primeiras civilizações resultaram no aperfeiçoamento do homem em técnicas de lavouras, criando assim meios e métodos para explorar o ambiente e garantir sua permanência no espaço (CAMPOS; MIRANDA, 2005). Portanto, o desenvolvimento das práticas agrícolas no meio rural foi a principal atividade econômica responsável pela constituição e manutenção das sociedades, por meio da existência de excedentes na produção o que propiciou as primeiras trocas comerciais (FIGUEIRA, 2007).

No período feudal, as técnicas utilizadas nos cultivos agrários ainda eram simples, praticamente toda a produção era para atender as necessidades básicas, os instrumentos de trabalho eram limitantes, pois tinham como matéria prima a madeira, o que justificava o desempenho produtivo baixo, limitando assim a ocorrência de trocas e do comércio (FIGUEIRA, 2007). Com o advento de novos instrumentos de trabalho a base de ferro, o manuseio de arreios de cavalos em substituição dos bois, com a finalidade de acrescentar mais força ao trabalho, a moagem de grãos e o moinho d'água ocorreram as primeiras inovações agrícolas responsáveis pelo desenvolvimento da produção (CAMPOS; MIRANDA, 2005).

No século XVII, na Europa, o aumento na utilização de terras para a produção de grãos ocorreu de forma rápida e se intensificou com o advento da Segunda Guerra Mundial, o que denotou novas características ao espaço geográfico, ocasionando mudanças estruturais no ecossistema e convertendo em sistemas cultiváveis um quarto da superfície do planeta. Dentre os impactos resultantes da incorporação de tais mudanças, a fauna e a flora são, em primeira instância, os maiores alvos das alterações nos ciclos biogeoquímicos do fósforo, nitrogênio e das águas, além da transformação característica nos ‘habitats’ resultante da degradação atual

de 1,2 bilhões de hectares de terra anteriormente com cobertura vegetal (CAMPOS; MIRANDA, 2005).

Logo, no período de 1960 a 2000, a incorporação das alterações agrícolas com o desenvolvimento técnico-científico tornou a agricultura totalmente dependente da tecnologia (AQUINO et al., 2007). A necessidade do aumento na demanda de alimentos produzidos trouxe consigo a justificativa para a utilização de alguns produtos químicos, afim de obter um maior controle de produção por meio da manipulação de fatores orgânicos (CAMPOS; MIRANDA, 2005).

A produção em larga escala de monoculturas ficou conhecida como “modernização agrícola” e o aspecto do domínio químico (agrotóxicos) nas práticas agrícolas foi denominada de “revolução verde”, a qual disseminava a proposta de erradicação da fome no planeta: “maiores rendimentos e mais comida para as pessoas de baixa renda”. Em resumo, o modelo seria de se utilizar “pacotes de insumos” fabricados por países desenvolvidos, que incluiriam sementes melhoradas, sistemas de irrigação, maquinários modernos e uma diversidade de substâncias químicas, onde os cultivos prioritariamente alvos seriam o de arroz, milho, trigo, soja e outras culturas de exportação (AQUINO et al., 2007).

Ressaltando que muitos países internacionais com o objetivo de propagar esse modelo produtivo nos países em desenvolvimento, passaram a pressionar para que os poderes públicos favorecessem intensamente a difusão dessa revolução comandando políticas de incentivo aos preços agrícolas e dessa forma beneficiar-se com a disponibilidade de compra. Outra medida adotada, foi de desenvolver novas empresas multinacionais fazendo com que esta transfira seu parque industrial poluidor para esses territórios, como foi o caso do Brasil, afim de produzir agrotóxicos de uso interno e externo no país, entre as décadas de 60 e 70 (AQUINO et al., 2007).

1.2. A Agricultura no Âmbito Nacional

No Brasil, os agrotóxicos passaram a ser utilizados inicialmente em programas de saúde pública com o objetivo de realizar o controle de vetores e parasitas. Com o advento da revolução verde, os agrotóxicos foram então vistos como modelo tecnológico afim de contribuir para o desenvolvimento da produção, a chamada modernização da agricultura nacional, entre 1945 e 1985 (SILVA et al., 2004, AUGUSTO et al., 2005).

Antes mesmo da década de 1950, o mercado do agrotóxico brasileiro passou a fazer parte do agronegócio. Por medida do governo, entrou em vigor o “Plano Nacional de Desenvolvimento Agrícola” que impôs ao agricultor, após a liberação de um “crédito rural”, o

condicionamento à compra obrigatória de agrotóxicos. Dessa forma, haveria o crescimento das indústrias de fabricação dos químicos e a dependência por parte dos agricultores (FERREIRA, 1999).

Construiu-se, portanto, um modelo de mercado caracterizado pelo alto grau de concentração, onde o consumo de agrotóxico expandiu-se, em média, 10% ao ano. E, em meados de 1970 até 2007, o Brasil tornou-se um dos seis maiores consumidores de agrotóxico do mundo (AUGUSTO et al., 2005). Segundo a Organização Mundial das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), o Brasil está no ranque dos países que mais exageram na utilização de químicos por hectare nas lavouras (CAIRES; CASTRO, 2006).

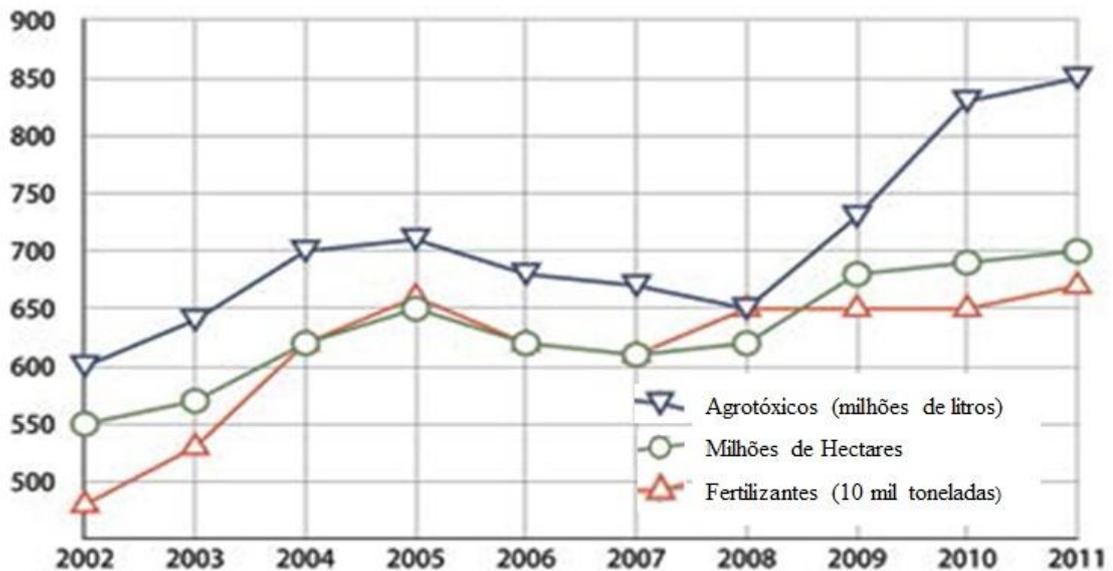
Em suma, a dinâmica de implantação dos modelos de produção que fazem uso de agrotóxicos poderão ser classificados em três fases: a primeira foi a implantação desse modelo de produção nos países chamados de Terceiro Mundo, na segunda ocorreu o período de desenvolvimento das técnicas utilizadas pelas empresas fazendo com que no resto do mundo houvesse uma agricultura massificada e na terceira, e última fase, ocorreu a consolidação dos modelos de produção gerando uma maior desigualdade entre países.

Atualmente, existem 430 ingredientes ativos (IAs), 750 produtos técnicos e 1.400 formulações de agrotóxicos registrados no Brasil, autorizados pelo Ministério da Saúde (MS) e pelo Ministério do Meio Ambiente (MMA), além dos produtos que não são regulamentados que continuam sendo utilizados pelos agricultores (FARIA et al, 2007). A Figura 01 mostra os índices crescentes de consumo de agrotóxicos e fertilizantes químicos por hectares no Brasil.

Na Anvisa, 14 exemplares de agrotóxicos estão em processo de revisão, sendo que: quatro destes já foram proibidos, a cihexatina e o tricloform foram retirados do mercado, o metamidofós está previsto para proibição a partir de junho de 2012 e o endosulfan em junho de 2013. O fosnete e o acefato foram apenas restringidos em seu uso, no entanto, estudos comprovaram, seus altos índices toxicológicos o que seria argumentação suficiente para a proibição (PIGNATI; MACHADO, 2007).

Outros dois já concluíram a consulta pública de revisão (forato e parationa-metílica) e os demais já tiveram suas notas técnicas de revisão concluídas pela Fiocruz: lactofem, furano, tiram, paraquat, glifosato, abamectina (PIGNATI; MACHADO, 2007).

Figura 1: Produção Agrícola e o consumo de agrotóxicos e fertilizantes químicos nas lavouras do Brasil, de 2002 a 2011.



Fonte: IBGE/SIDRA (1998-2011).

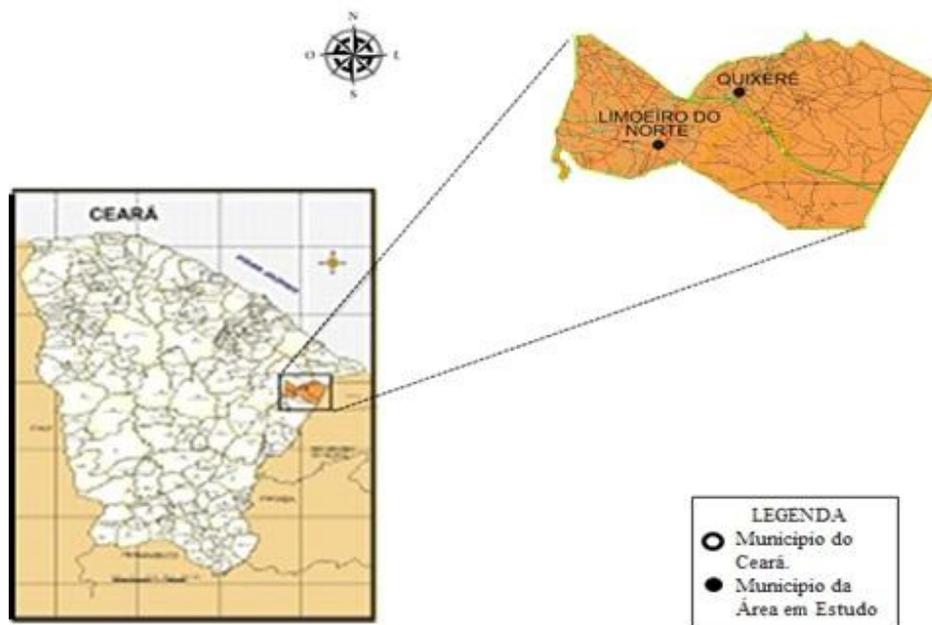
Os elevados índices na utilização de agrotóxicos estão estreitamente relacionados com o aumento no plantio de soja transgênica, a ampliação do consumo de glifosato, a necessidade de controle das ervas “daninhas”, fungos e diversos insetos. Essa condição propicia ao aumento de doenças nas lavouras, como a ferrugem asiática na soja, e quando atrelado as condições de preços baixos por isenção de impostos na compra de agrotóxicos, torna-os ainda mais estimulantes para o consumo (PIGNATI; MACHADO, 2007). Valendo destacar que os fertilizantes químicos, em especial, mantiveram seu nível de média de consumo por hectare.

As modificações nas fronteiras agrícolas e o agronegócio chegaram ao semiárido do nordeste brasileiro por meio da implementação de empresas transnacionais e nacionais. No estado do Ceará, verificou-se um comportamento bastante semelhante ao que vem ocorrendo no país, onde os consumos de agrotóxicos intensificaram-se com o aumento de vendas em cerca de 100%, passando, em 2005, de 1.649 toneladas de produtos para 3.284 toneladas em 2009. Em relação aos IAs, o aumento durante o mesmo período foi de 96,33% (PIGNATI; MACHADO, 2007).

Estudos epidemiológicos envolvendo a contaminação por agrotóxicos, nas comunidades da Chapada do Apodi, nos municípios de Limoeiro do Norte e Quixeré, regiões estas no Ceará onde há atividade de fruticultura para exportação (Figura 02), destacaram-se como as mais afetadas pelos malefícios causados ao ambiente e, conseqüentemente, aos produtos alimentícios, por meio, principalmente, da presença de produtos tóxicos na água. A

disseminação da contaminação ocorre devido as variadas formas de pulverização, com destaque para a pulverização aérea que é adotada em muitos cultivos de banana e realizada de seis a oito vezes ao ano, além do descaso no manuseio e descarte de embalagens (RIGOTTO et al, 2011).

Figura 2: Mapa da localização no Estado do Ceará das comunidades da Chapada do Apodi, de forma específica os municípios de Limoeiro do Norte e Quixeré alvos do estudo.



Fonte: RIGOTTO (2011).

Estas regiões foram eleitas pelas grandes empresas transnacionais de fruticultura por localizar-se em socioespaços da Região do Nordeste Brasileiro, cuja as vantagens eram diversas, entre elas estão:

- O baixo custo da terra, desvalorizada pela falta de políticas públicas;
- A disponibilidade de água, cujo os empresários de fruticultura progressivamente se apropriavam, como exemplo temos a exploração descontrolada do aquífero Jandaía e o uso das águas do rio São Francisco, ameaçadas de transposição para atender as demandas empresariais;
- Disponibilidade de contingente de trabalhadores que ameaçados pelos elevados níveis de pobreza e insegurança social, candidatavam-se a ofertas de emprego precárias;

- A fragilidade dos programas de proteção ambiental, pois muitas eram as dificuldades para licenciar, monitorar, fiscalizar, diagnosticar, informar adequadamente e fazer valer as leis vigentes;

As comunidades que foram atingidas de maneira efetiva pelas empresas agroquímicas apresentaram repercussões diversas de contaminação ambiental e também de problemas na saúde pública. A vulnerabilidade, principalmente, por parte dos trabalhadores foi descrita no estudo de Alexandre (2009), onde foi evidenciado 53% de casos de agricultores, oriundos das monoculturas de abacaxi, apresentando alterações na função hepática.

Ainda delimitando o quadro grave de problemas na saúde dos trabalhadores da região, podemos citar o estudo de Rigotto (2011), onde mais de 94% dos trabalhadores no agronegócio e na agricultura familiar foram, em algum momento, expostos a agrotóxicos, 30% desses agricultores exerciam atividades com exposição direta a tóxicos e 60% estavam envolvidos em atividades paralelas ao uso, como exemplo o armazenamento, transporte e descarte de embalagens.

1.3. Implicações no Uso de Agrotóxico

O termo agrotóxico, de acordo com o decreto nº. 4,074, de 4 de janeiro de 2002, que regulamenta a Lei nº. 7.802, de 11 de Julho de 1989, defini-os como produtos e agentes físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento, beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas naturais ou plantadas e de outros ecossistemas e também em ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora e da fauna, afim de preservá-las da ação danosa dos seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias de produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores do crescimento (PIGNATI; MACHADO, 2007).

É sabido que os agrotóxicos são substâncias ou compostos químicos com características próprias e sua essência de toxicidade assim como seu mecanismo de ação também são próprios. Porém, nos anos de pós-guerra, era necessário firmar na sociedade sua aceitação, dessa forma foram denominados de biocidas, pesticidas, defensivos agrícolas, fitossanitários, remédios agrícolas e outros (SILVA et al., 2004). Atualmente, tais produtos químicos são também utilizados no combate de doenças, nas áreas urbanas para controle sanitário, mas sua função principal é no aumento da produtividade de alimentos na agricultura (FARIA et al., 2007).

Os agrotóxicos podem ser classificados em acaricidas, bactericidas, fungicidas, herbicidas, inseticidas, nematicidas, raticidas, vermífugos, entre outros, de acordo com as pragas que se queira controlar. Além de também serem classificados em orgânicos, os carbamatos (nitrogenados), clorados, fosforados e clorofosforados; inorgânicos, cujas composições químicas apresentam arsênio, tálio, bário, nitrogênio, fósforo, cádmio, ferro, selênio, chumbo, cobre, mercúrio e zinco; e os botânicos, compostos de nicotina, piretrina, sabadina e rotenona (extraídas do timbó ou tingui- planta tóxica utilizada por índios brasileiros) (SILVA, 2004). A tabela 1 apresenta a classificação dos principais grupos químicos que compõem as classes de agrotóxicos mais utilizados no agronegócio.

Tabela 1: Classificação dos principais grupos químicos que compõem as classes de agrotóxicos mais utilizados no agronegócio.

TIPOS DE INSETICIDAS	EXEMPLOS:
ORGANOCOLORADOS	Ciclodienos : Aldrina, Dieldrina, Endrina, Clordano, Toxafeno, Telodrina, Isodrina, Endossulfam, Heptacloro e Mirex. Diclorodifeniletanos: DDT e metabólitos, 2,2-bis(p-clorofenil)-1,1-dicloroetileno (DDE), 1,1-dicloro-2,2-bis(p-clorofenil)etano (DDD) e o Metoxicloro. Isômeros de Hexaclorobenzeno: hexaclorocicloexanos (HCH), sendo o Lindano, ou -HCH, o mais importante deles.
ORGANOFOSFORADOS E CARBAMATOS	Diclorvós, Clorpirifós, Parationa, Diazinona, Carbaril e Carbofurano.
FUNGICIDAS	Vinclozolina - Usada em frutas e verduras e apresentam atividades anti-androgênicas.
HERBICIDAS	Triazinas: Atrazina e simazina, linurom, diurom e os seus metabólitos.
ORGANOMETÁLICOS	Tributilestanho (TBT): Moluscicida, biocida e inseticida, bem como estabilizante de plásticos à base de policloreto de vinila (PVC).

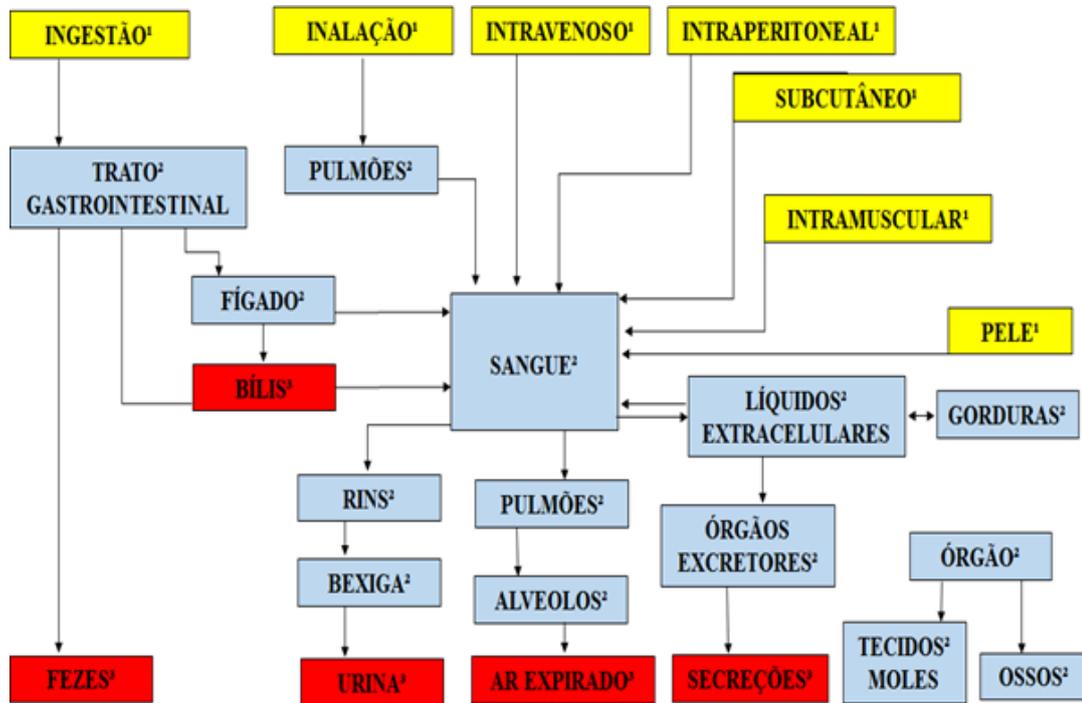
Fonte: SILVA (2004)

É possível também agrupá-los em quatro graus de toxicidade, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), utilizando dados baseados na dose letal média ou DL-50, dose de determinada substância química necessária para matar 50% dos animais da mesma espécie quando administrada pela mesma via. A primeira classificação dada ao grau de toxicidade é composta pelos químicos extremamente tóxicos, sinalizado nas embalagens com a cor vermelha, o segundo grau é dito como altamente tóxico, de cor amarela, o terceiro grau é o medianamente tóxico, com a cor azul, e por fim no quarto grau se enquadram os pouco tóxicos cuja a identificação é da cor verde (SILVA et. al, 2004).

Ainda que alguns agrotóxicos possam ser classificados como medianamente ou pouco tóxicos, as consequências crônicas a longo prazo não devem ser ignoradas, pois os efeitos podem ocorrer no decorrer de meses, anos ou até mesmo décadas após a exposição. Os danos ocasionados pelo uso indiscriminado dos agrotóxicos acarretam tanto problemáticas ao meio ambiente, pois podem causar a contaminação e até mesmo a desertificação do solo, além da degradação dos recursos naturais, alguns de forma irreversível, levando a ocorrência de desequilíbrios biológicos e ecológicos, quanto a saúde pública (FARIA et al., 2007).

Os efeitos nocivos à saúde ocupacional resultantes do contato com agrotóxico, tanto a curto como a longo prazo, estão associados a diversos sintomas como dificuldades respiratórias, problemas de memória e de pele, cânceres, depressão, más-formações congênitas, distúrbios endócrinos e neurológicos, entre outros. As principais vias de penetração dos agrotóxicos no organismo humano podem ocorrer por meio da ingestão, respiração ou absorção dérmica (Figura 03), as quais serão influenciadas pela formulação empregada, a temperatura, a umidade relativa do ar, a região do corpo que entrou em contato (como mãos, pulsos, pés, entre outros), tempo de contato e se existe ou não feridas que sirvam como porta de entrada (FARIA et al., 2007).

Figura 3: Caminhos das substâncias tóxicas no organismo, absorção¹, distribuição² e eliminação³.



Fonte: SILVA (2004)

De acordo com a Norma Reguladora NR-06 (1978), da Consolidação das Leis de Trabalho, relativa a Segurança e Medicina do Trabalho, determina que o uso de Equipamentos de Proteção Individual (EPI) é necessário e obrigatório para reduzir os riscos e manter a saúde do trabalhador (SILVA, et al. 2004). Segundo Faria (2007), a utilização inadequada ou a abstenção de tais mecanismos de proteção acarretam o aumento ao risco de desenvolver mutações genéticas, câncer e até a morte.

Dentre as outras formas de cultivo, os profissionais das agroindústrias, também conhecidos como grandes produtores, são altamente expostos a esses compostos em relação aos trabalhadores da agricultura familiar, por exemplo, porque manipulam, diluem, preparam as “caldas”, aplicam os agrotóxicos e entram nas lavouras após a aplicação (ALMEIDA, 2007). Destacando-se também as famílias destes agricultores, pois manipulam a roupa trazida do campo pelo agricultor ou por morarem próximo as áreas pulverizadas.

Os casos de intoxicação por agrotóxicos podem causar quadros agudos, que se caracterizam por efeitos imediatos em espaços de tempo de exposição bem curto, ou podem causar quadros crônicos, neste caso a exposição é por tempo contínuo e há a manifestação de inúmeras doenças (Tabela 02). No Brasil, estima-se que mais de 400.000 pessoas são contaminadas por agrotóxicos ao ano, embora haja um grande número de subnotificação, e, de

acordo com estudos epidemiológicos, é crescente a incidência de casos de cânceres em agricultores, como o câncer no sistema linfático e hematopoiético, tornando-se de extrema relevância os estudos nos mecanismos ação afetados pelos agrotóxicos comprometendo assim a saúde humana (ALMEIDA, 2007).

Tabela 2: Relação entre os tipos de exposição a agrotóxicos e os sinais e sintomas clínicos presentes.

	EXPOSIÇÃO	
	Única ou por período curto	Continuada ou por período longo
SINAIS E SINTOMAS AGUDOS	Náuseas; Cefaleia; Tontura; Vômito; Fasciculação Muscular; Desorientação; Dificuldade respiratória; Coma; Morte.	Hemorragia; Hipersensibilidade, Teratogênese e Morte Fetal.
SINAIS E SINTOMAS CRÔNICOS	Paralisias reversíveis; Ação Neurotóxicas retardada irreversível; Pancitopênia.	Lesão Cerebral Irreversível; Tumores Malignos; Atrofia Testicular; Dermatites de Contato, Catarata; Atrofia Óptica, Lesões Hepáticas; etc.

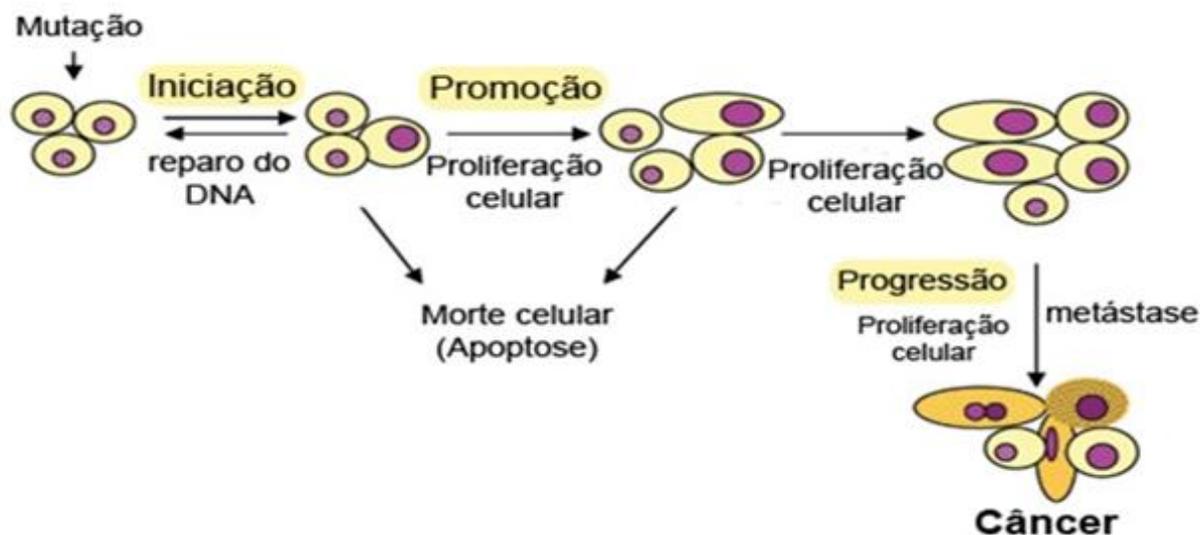
Fonte: ALMEIDA (2007)

1.4. Câncer e os Efeitos Carcinogênicos dos Agrotóxicos

O conjunto de manifestações clínicas patológicas caracterizadas principalmente pela perda do controle no crescimento celular e o ganho da capacidade de se expandir pelos demais tecidos adjacentes do organismo (metástase) é denominado de câncer (RIBEIRO; SALVADORI; MARQUES, 2003).

O processo de carcinogênese, ou seja, de formação do câncer, em geral ocorre lentamente e caracteriza-se por mudanças funcionais na célula que culminam em um descompasso do seu ciclo replicativo e perda do controle da divisão celular. Esse processo divide-se em várias fases: o primeiro estágio é o de iniciação, onde as células encontram-se geneticamente alteradas, porém ainda não é possível detectar os tumores clinicamente; o segundo estágio é o de promoção, onde nas células alteradas encontram-se comprometidos os genes reguladores do crescimento celular o que por consequência torna as células malignas; até que chegam ao terceiro e último estágio que é chamado de progressão, onde ocorre a multiplicação descontrolada e irreversível das células alteradas, haverá as primeiras manifestações clínicas da doença (Figura 4) (RIBEIRO; SALVADORI; MARQUES, 2003).

Figura 4: Processo detalhado da carcinogênese



Fonte: RIBEIRO; SALVADORI; MARQUES (2003).

As alterações genéticas decorrentes do desenvolvimento do câncer ocorrem em duas classes de genes reguladores do crescimento que estão naturalmente presentes em células normais: os proto-oncogenes e os genes supressores de tumor (CLARKE et al., 2011).

Os proto-oncogenes podem transformar-se em oncogenes por meio de duas vias: mudanças na estrutura dos genes, resultando em produtos genéticos aberrantes, ou mudanças na regulação e expressão do gene, resultando em produção errônea de proteínas. Os tipos de mutações gênicas mais encontradas em oncogenes que atuam como precursores do câncer são as mutações em ponto, as translocações cromossômicas e a amplificação gênica. Esses genes ainda extremamente ligados a produção de oncoproteínas atuantes durante as várias etapas do ciclo celular (CLARKE et al., 2011).

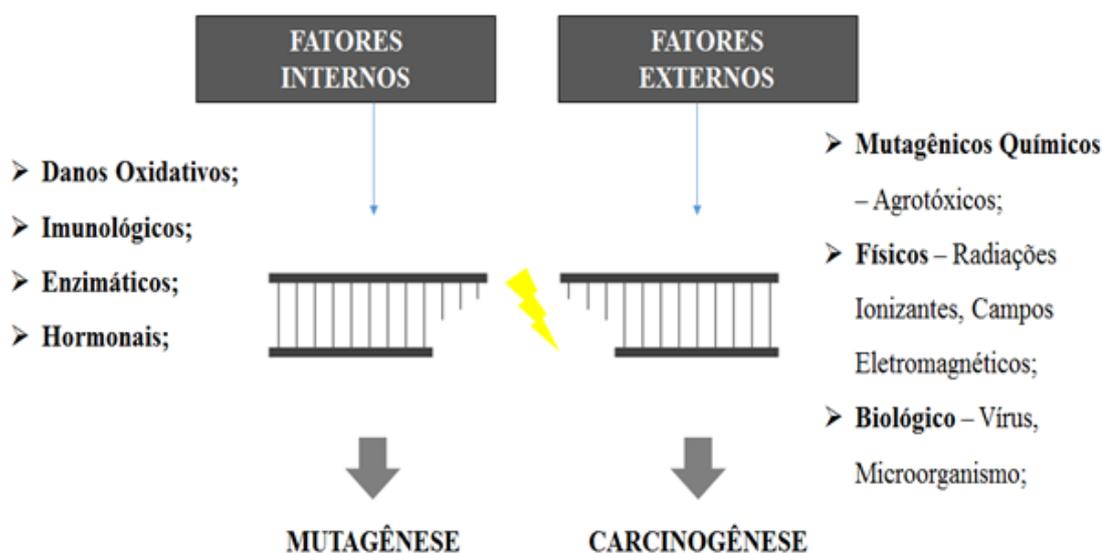
Já os genes supressores de tumor (anti-oncogenes) são naturalmente responsáveis pela inibição da divisão celular, porém os mecanismos envolvidos nesse processo ainda são pouco conhecidos. São exemplos, o gene *Rb*, localizado no cromossomo 13q14, e o gene *TP53*, localizado no cromossomo 17p13 (CLARKE et al., 2011).

A maioria dos processos carcinogênicos apresentam propriedades de ação em comum, tendo o DNA como alvo primário para que ocorram as reações eletrofílicas de ataque à molécula (CLARKE et al., 2011). A base nitrogenada mais suscetível a esse tipo de lesão é a Guanina, o que pode acarretar as mutações do tipo “start” para as fases iniciais do câncer (RIBEIRO; SALVADORI; MARQUES, 2003).

As células quando regularmente expostas a agentes mutagênicos buscam reconhecer e corrigir tais danos por meio de mecanismos próprios de reparo a fim de manter a sua integridade genômica. Os fatores indutores externos que possuem a função mutagênica são

classificados em químicos, físicos e biológicos, já os agentes indutores internos podem ser do tipo hormonais, imunológicos e enzimáticos. A figura 5 demonstra alguns tipos de fatores mutagênicos (RIBEIRO; SALVADORI; MARQUES, 2003).

Figura 5: Esquema representativo da ação de fatores mutagênicos (externos e internos) causando a quebra da dupla fita da molécula de DNA.



Fonte: KAO et al (2005).

Dentre os fatores promotores, destacam-se os agrotóxicos, exemplo de fatores mutagênicos químicos, pois atuam diretamente na indução dos processos carcinogênicos por meio dos mais variados mecanismos mediadores de genotoxicidade. A exemplo de alterações no indivíduo exposto, temos que as vias hormonais e as vias imunológicas são frequentemente danificadas, além do estímulo a liberação de moléculas oxidantes no organismo (RODVALL; DICH; WIKLUND, 2003).

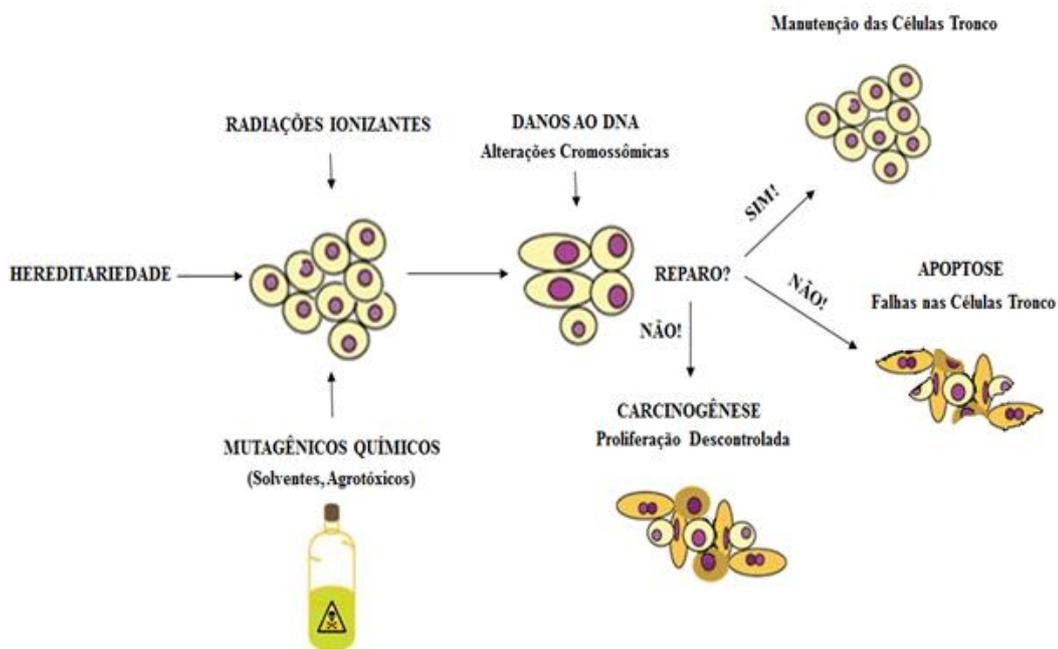
De modo geral, as influências dos agrotóxicos merecem destaque principalmente quando vinculados à alimentação. No Brasil, Meyer et al. (2003) mostrou uma alta taxa de mortalidade para câncer de estômago, esôfago, laringe, câncer oral e leucemias em agricultores expostos a agrotóxicos na região Serrana do Rio de Janeiro. Já Koifman, Koifman e Meyer, (2002) descreveram o mesmo resultado nas neoplasias malignas de mama, ovário e próstata, em amostra de grupos populacionais expostos a agrotóxicos no período de 1985 a 1990.

Porém mesmo diante de tais estudos envolvendo agrotóxicos, assim como para muitas das outras substâncias químicas, as evidências científicas relacionadas aos mecanismos de indução do câncer requerem maiores estudos para sua elucidação (POTTI, et al., 2003).

1.5. Lesão ao DNA

O processo rigoroso de transmissão das informações genéticas de uma célula mãe para as células filhas é a chave para a sobrevivência dos organismos multicelulares. Tal transmissão requer extrema fidelidade na replicação celular e precisão na distribuição cromossômica, além da capacidade de sobreviver a ameaças de danos endógenos e exógenos (Figura 6) (HOEIJMAKERS, 2009).

Figura 6: Descrição do comportamento celular quando a molécula de DNA é acometida por danos.



Fonte: KAO et al (2005).

De maneira mais específica, com a finalidade de solucionar a ação de tais danos, a célula apresenta duas estratégias evolutivas para lidar com esses possíveis erros: Primeiramente, as lesões que acometem a molécula de DNA serão rigorosamente corrigidas por meio de mecanismos de reparo específico para cada tipo de modificação, com o objetivo de reestabelecer a sequência original, ou essas lesões serão “toleradas” pela célula por não serem de grandes consequências para o seu metabolismo; a outra estratégia que pode ser utilizada é a capacidade celular de abrigar tais erros no material genético e induzir a célula à morte, pois dessa forma evitariam os efeitos da multiplicação de uma célula inviável no organismo (IYAMA e WILSON, 2013).

Tais mecanismos de reparo são ditos como mecanismos vigilantes essenciais pois suas vias reguladoras são responsáveis por realizar a verificação de danos ao longo da molécula de

DNA e, após a identificação, atuam no controle dos pontos de paradas no ciclo celular, controle dos movimentos das proteínas de reparação e, quando o reparo não é “bem-sucedido”, induz a célula a morte por apoptose (IYAMA e WILSON, 2013).

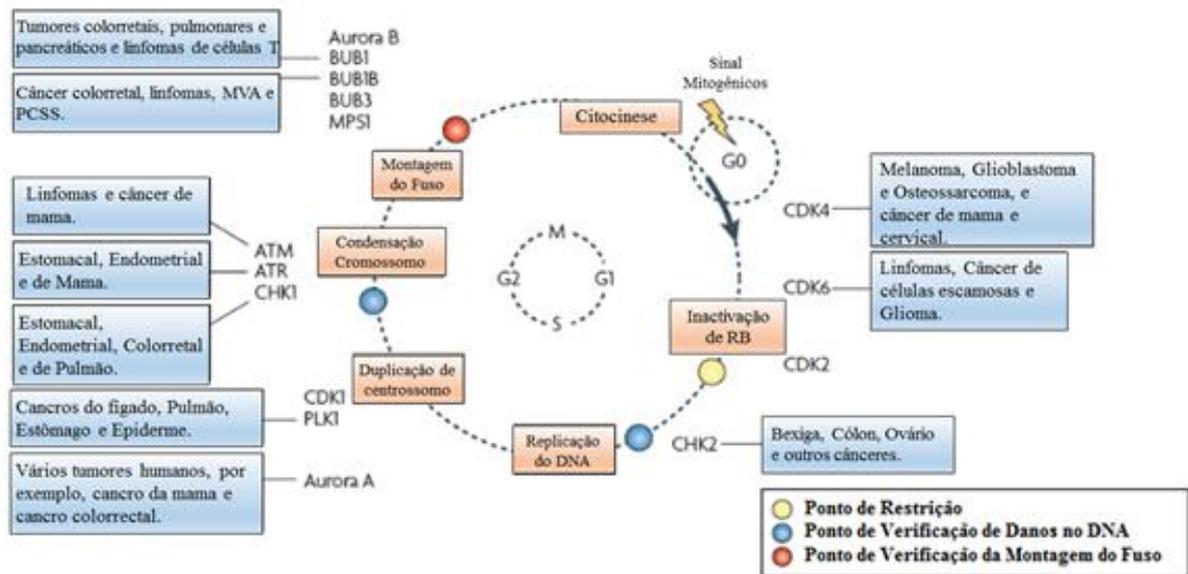
Nesse contexto, é essencial ressaltar que quando essas lesões celulares não são possíveis de serem corrigidas e caso está célula não entre em apoptose, as modificações biológicas resultantes são instabilidade genômica celular, alterações na transcrição de alguns genes, falhas reprodutivas, mutações herdáveis ou doenças como câncer (OZTURK e DEMIR, 2011).

Independente do mecanismo que deva ser utilizado, o reparo da lesão à molécula de DNA é indispensável para a manutenção da integridade do genoma e para o bom funcionamento metabólico da célula (KENYON; GERSON, 2007; OZTURK e DEMIR, 2011), que por sua vez é essencial para a viabilidade e longevidade de um organismo saudável (KENYON; GERSON, 2007; IYAMA e WILSON, 2013).

1.5.1. Ciclo celular e o Sensoriamento de Lesões no DNA

Compondo a cascata de sinalização celular em resposta aos efeitos dos fatores carcinogênicos sobre a molécula de DNA, destacasse a ação de diversas proteínas efetoras atuantes no controle do ciclo celular (Figura 7). Dentre estas, o grupo da superfamília de proteínas chamada PI3K (fosfatidilinositol 3-quinases), em humanos, é composta pelas proteínas ATM (ataxia telangiectasia mutada), ATR (ATM- e Rad3-related), ATX/SMG-1 e DNAPK (mTOR/FRAP e DNA - dependente proteína quinase) que apresentam a função de sensores e/ou iniciadores dos mecanismos de reparo (BAO et al., 2001; LEMPIAINEN; HALAZONETIS, 2009).

Figura 7: Cascata de sinalização proteica do ciclo celular e suas doenças correspondentes de acordo com os alvos moleculares afetados por fatores carcinogênicos.

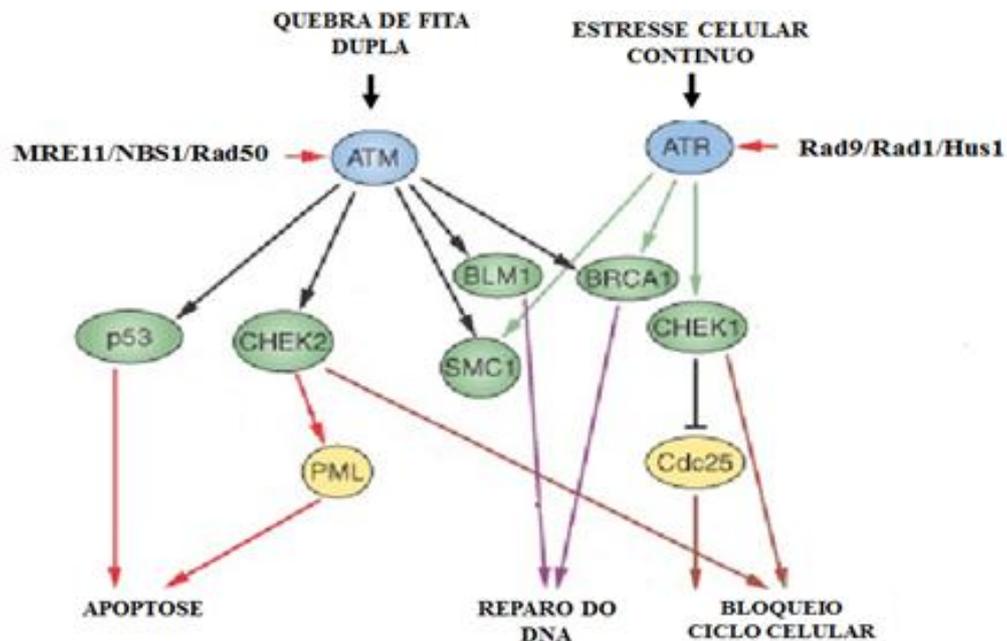


Legenda: ATM, ataxia telangiectasia mutated; ATR, ataxia telangiectasia, RAD3-related protein; BUB1, budding uninhibited by benzimidazoles 1; BUB1B, BUB1 homologue beta; MPS1, monopolar spindle 1; MVA, mosaic variegated aneuploidy; PCSS, premature chromatid separation syndrome; RB, retinoblastoma protein family members. **Fonte:** Adaptado de Lapenna e Giordano (2009).

O mecanismo de transdução de sinais inicia-se com a detecção do dano ou alteração da cromatina que posteriormente irão mediar a ativação dos transdutores. Sabe-se que o gene *ATM* atua como transdutor primário e é o responsável por ativar a via de resposta ao dano no ciclo por meio da fosforilação da proteína p53. Posteriormente, esse sinal é transmitido para as proteínas de reparo próprias do DNA inerentes ao maquinário do ciclo (ALEXANDER; WALKER, 2010; BENSIMON et al., 2011).

Tanto a proteína ATM quanto a ATR podem ser ativadas quando na presença de danos (Figura 8), porém ainda não é bem esclarecido como elas os reconhecem. A ativação do ATM ocorre na presença de quebras na fita dupla do DNA, algumas lesões induzidas por radiações ionizantes e espécies reativas de oxigênio, e conduz a célula ao bloqueio do ciclo celular em qualquer uma das fases G1, S e G2 (BENSIMON et al., 2011).

Figura 8: Apresentação esquemática das proteínas atuantes na ativação do sensoriamento molecular da proteína *ATM* e *ATR*.



Legenda: ATM, ataxia telangiectasia mutated; ATR, ataxia telangiectasia, BRCA1, Breast Cancer Susceptibility Gene. **Fonte:** Adaptado de Lempiainen e Halazonetis. (2009).

1.6. Mecanismos de Reparo do DNA

Afim de garantir a integridade genômica, preservar o metabolismo celular e minimizar o número de mutações herdáveis os mecanismos de reparação do DNA atuam corrigindo danos e neutralizando os efeitos letais causados por fatores carcinogênicos (KIM et al., 2001; HOEIJMAKERS, 2009; IYAMA; WILSON, 2013).

As vias de reparo são compostas por proteínas especializadas em explorar a extensão do genoma e garantir a ausência de erros no código da dupla fita celular. Porém, uma vez que a proteína reconheça uma lesão de base incompatível ou bases estruturalmente alteradas, desencadeia-se um reparo eficiente de DNA que finalmente leva a restauração da informação (IYAMA; WILSON, 2013).

Existem diversas vias de reparo da molécula de DNA, além de um grande e diversificado número de enzimas atuando no mecanismo. Por exemplo, quando o dano acomete a fita simples de DNA, a correção ocorrerá por meio da via de reparo por excisão de bases (BER) ou a via de reparo por excisão de nucleotídeos (NER). Tais vias realizam o reparo por meio da ação da enzima polimerase que utiliza a fita complementar íntegra como molde. Já o mecanismo MMR é responsável por reparar especificamente inserções de bases e deleções incorporadas ao DNA que possam surgir ao longo da replicação e recombinação do DNA (KAO et al., 2005).

Quando esses danos acometem as duas fitas do DNA (*Double Strands Breaks*, DSB), dano esse foco do estudo, os mecanismos de reparo podem ser de dois tipos: recombinação homóloga (*homologous recombinational repair* - HRR) e junção de extremidades não-homólogas (*non-homologous end joining* - NHEJ) (WETERINGS; VAN GENT, 2004). Estudos demonstram que os dois mecanismos de reparo atuam em momentos distintos nas diferentes fases do ciclo celular (BURMA et al., 2006; SONODA et al., 2006).

A NHEJ atua quase que sozinha no reparo da dupla hélice na fase G1 do ciclo celular, enquanto que a HR começa a ter a sua atuação no final da fase S até G2 (BURMA et al., 2006; SONODA et al., 2006). Isso pode ser compreendido pelo fato de a recombinação homóloga requerer um molde – a fita homóloga intacta –, para que ocorra o reparo, e esta fita homóloga só está disponível no final da fase S (WETERINGS, VAN GENT, 2004).

As DSB são o tipo de lesão no DNA de ação mais letal e cujo os efeitos biológicos são maiores para a formação de doenças humanas como defeitos no desenvolvimento imunológico e neurológico, fenótipos de envelhecimento precoce e propensão ao câncer (IYAMA e WILSON, 2013). Dessa forma, com o objetivo de lidar com esta lesão, as células ativam uma complexa rede de vias que conduzem para a reparação dos danos e a retomada do ciclo celular normal. Porém, falhas no reparo correto teriam como principais consequências a formação de rearranjos cromossômicos, incluindo deleções e translocações que, por sua vez, atuam promovendo a transformação neoplásica (BENSIMON et al., 2011).

1.6.1. Mecanismos de Reparo de Lesões de Fita Dupla no DNA (DSB)

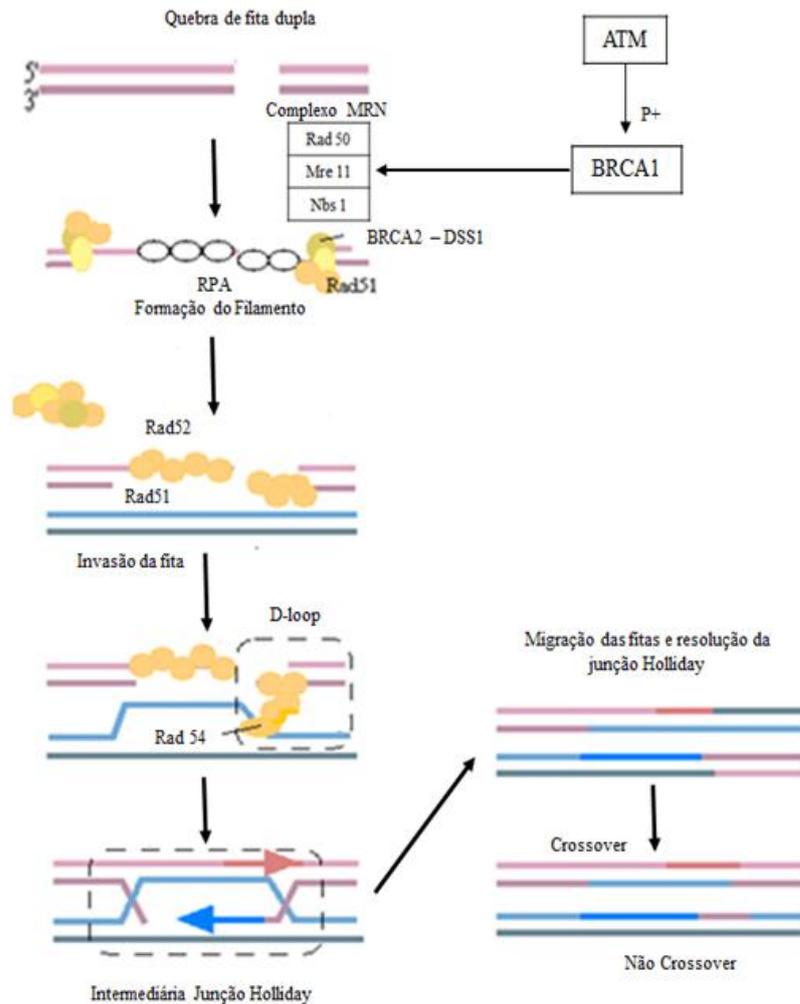
1.6.1.1. Recombinação Homóloga (HR)

A recombinação homóloga é um mecanismo que repara uma variedade de lesões no DNA, o que inclui quebras na dupla fita (DSBs) e ligações cruzadas intercadeias. Na recombinação homóloga a cromátide lesionada entra em contato com a não lesionada, e por homologia de sequência, é feita a recombinação entre as mesmas. Dessa forma, esse tipo de reparo promove uma alta fidelidade e está menos propenso a erros (BELLI; SAPORA; TABOCCHINI, 2002; IYAMA e WILSON, 2013).

A via de reparo HR envolve o processo de rearranjo físico entre as extremidades da molécula de DNA e pode ser dividido em três etapas: pré-sináptica, sinapse e pós-sinapse. Inicialmente, na fase de pré sinapse, as pontas de quebra são reconhecidas e há ressecção da hélice na ponta 5' terminal por ação de nucleases, posteriormente ocorre o processo de invasão da fita molde de DNA homólogo, formando uma estrutura conhecida como junção de

Holliday. Por fim, a síntese é realizada prosseguindo com a migração da cadeia seguida pela construção do heteroduplex (IYAMA e WILSON, 2013) (Figura 9).

Figura 9: Apresentação esquemática das proteínas atuantes nos mecanismos de reparo por recombinação homologa em danos de fita dupla no DNA (DSBs).



Fonte: Adaptado de Pandita et al. (2003).

No início do processo de recombinação ocorre a ressecção das regiões de quebra e está é feita pelo complexo MRN, formado pelas proteínas RAD50-Mre11-NBS1, atuando um pouco antes da associação da proteína RAD51. A RAD51, membro da família RAD (Radiation-Sensitive Yeast Mutants), atua se associando às regiões de fita simples e é responsável pela sobreposição dessa fita no DNA homólogo, garantindo a fidelidade das cópias entre as fitas (VAN GENT; HOEIJMAKERS; KANNAR, 2001).

Uma outra família de genes importante para a recombinação é a família BRCA (Breast Cancer Susceptibility Gene), a qual pertence os genes *BRCA1* e *BRCA2*, localizados nos cromossomos 17p21.3 e 13q12, respectivamente, e cuja função é associar-se ao complexo de

proteínas RAD e atuar nas extremidades das DSBs. Além disso, o gene *BRCA1* também é conhecido por sua interação com o gene *TP53* o que reforça a teoria de ser um gene ligado a reparação do DNA (YOSHIBA; MIKI, 2004; RIBEIRO-JR, 2012; RIBEIRO-JR, 2015).

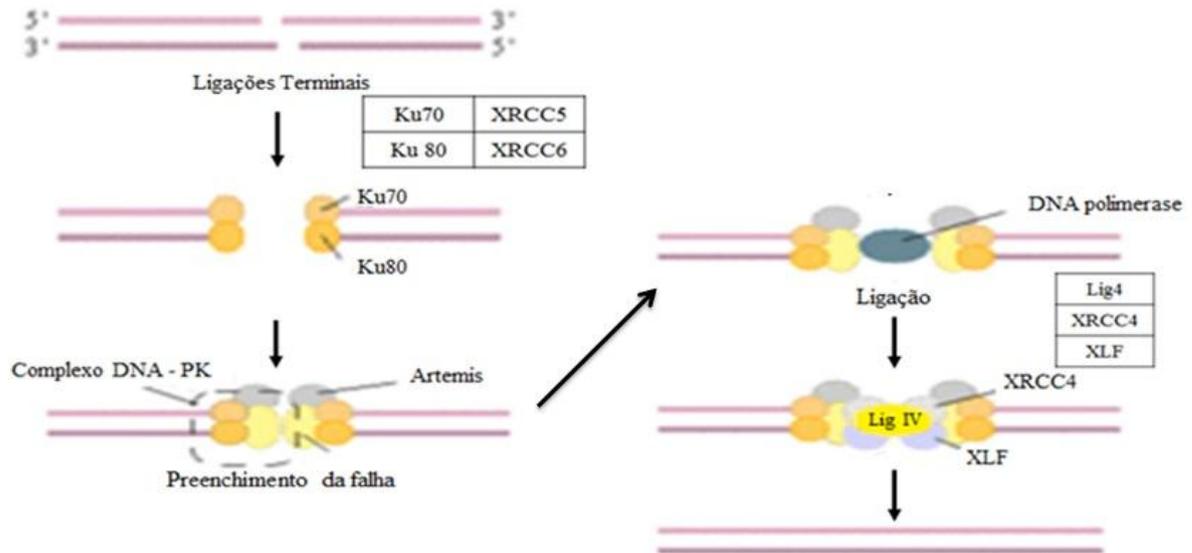
1.6.1.2. Junção por Extremidades não Homólogas (NHEJ)

O reparo por junção das extremidades não homólogas (NHEJ) é a principal via de reparo em mamíferos e ocorre por meio da junção das extremidades de fitas quebradas mesmo não sendo reparadas com o auxílio de uma homóloga como molde, por isso é dita como uma via não livre de erros (PASTWA; BLASIAK, 2003; VALERIE; POVIRK, 2003).

Nesse caso, devido as duas extremidades da fita de DNA serem simplesmente reconectadas, a probabilidade de ocorrerem inserções e deleções é grande, prejudicando assim a estabilidade do genoma e dando oportunidade para que apareçam alterações cromossômicas (BURMA et al., 2006).

Os principais complexos proteicos atuantes no mecanismo NHEJ são: o KU 70, que é codificado pelo gene *XRCC6* localizado no cromossomo 22q13.2, e o KU80, codificado pelo gene *XRCC5* localizado no cromossomo 2q35, que se ligam as extremidades danificadas juntamente com a DNA Ligase IV, codificada pelo gene *LIG4* localizada no cromossomo 13q33, unindo-a por meio de uma reação dependente de ATP, afim de reparar a lesão (Figura 10) (DIFILIPPANTONIO et al., 2000, ECONOMOPOLOUS et al., 2010; RIBEIRO-JR et al, 2015).

Figura 10: Apresentação esquemática das proteínas atuantes nos mecanismos de reparo de Junções por extremidades não homólogas (NHEJ) em danos de fita dupla no DNA. (DSBs).



Fonte: Adaptado de Pandita et al. (2003).

Além dessas proteínas, recentemente foi relatada a descoberta de uma outra que também parece estar envolvida na via NHEJ (AHNESORG; SMITH; JACKSON, 2006). Ahnesorg, Smith e Jackson (2006) identificaram uma proteína denominada XRCC4-like factor. Os mesmos autores mostraram que XLF interage diretamente com o complexo XRCC4-Ligase IV e que a repressão de XLF em linhagens celulares humanas promove radiosensibilidade e uma diminuição na eficiência de NHEJ.

Atualmente, muitos estudos vêm demonstrando que a expressão dos genes e as proteínas de reparo do DNA podem afetar a capacidade celular de reagir as lesões no seu material gênico (ECONOMOPOULOU et al, 2010). Dessa forma, o estudo das alterações cromossômicas atrelado a expressão dos genes *BRCA1*, *BRCA2* e *RAD51*, do reparo por recombinação homóloga (HR) atrelado aos genes *XRCC5*, *XRCC6* e *LIG4*, do reparo por junção de extremidades não homólogas (NHEJ), e mais o gene *ATM* é de fundamental importância no auxílio a compreensão dos danos ao mecanismo de reparo das células quando expostas a mutagênicos químicos como o agrotóxico, contribuindo, assim, para a saúde e bem-estar dos trabalhadores rurais.

2. OBJETIVO

2.1. OBJETIVO GERAL

Analisar a expressão dos genes *ATM*, *BRCA1*, *BRCA2*, *XRCC5*, *XRCC6*, *RAD51* e *LIG4*, genes pertencentes ao mecanismo de reparo de fita dupla do DNA, de trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos.

2.2. OBJETIVO ESPECÍFICO

- Identificar as principais alterações cromossômicas em amostras de medula óssea de trabalhadores rurais exposto a agrotóxicos;
- Avaliar a expressão de genes *ATM*, *BRCA1*, *BRCA2*, *XRCC5*, *XRCC6*, *RAD51* e *LIG4*, genes de reparo de fita dupla do DNA por PCR em tempo real;
- Associar com achados citogenéticos com as possíveis alterações na expressão dos genes de reparo *ATM*, *BRCA1*, *BRCA2*, *XRCC5*, *XRCC6*, *RAD51* e *LIG4*, em trabalhadores rurais expostos a agrotóxico.
- Associar as alterações citogenéticas com o tipo de agricultura a que o trabalhador está submetido como a Agricultura Familiar, Agricultura Ecológica e Grande Produtor, e avaliar suas correlações.
- Associar as alterações na expressão dos genes de reparo com o tipo de agricultura a que o trabalhador está submetido como a Agricultura Familiar, Agricultura Ecológica e Grande Produtor, e avaliar suas correlações.
- Associar as alterações na expressão dos genes com as principais variáveis associada a exposição, por exemplo, o tempo de exposição a agrotóxicos, tipos de pesticidas utilizados, tipo de agricultura realizada e uso de EPIs.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

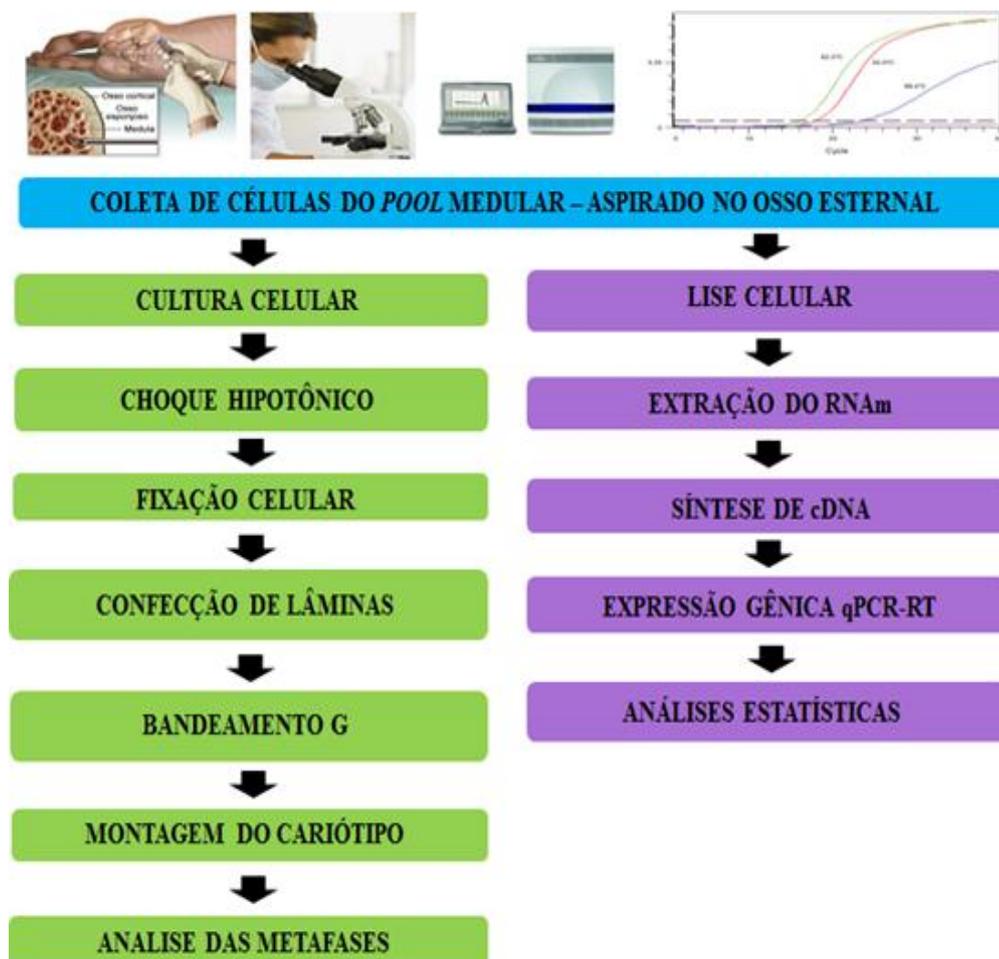
3.1. Aspectos Éticos

O estudo realizado foi submetido ao Comitê de Ética do Hospital Universitário Walter Cantídio, da Universidade Federal do Ceará - através do sistema da Plataforma Brasil, com o número de protocolo CEP N° 016.02.1 (ver no Apêndice A), tendo cumprido todas as exigências da resolução 196/96 do Conselho Nacional da Saúde.

Foram excluídos deste estudo indivíduos com história prévia ou atual de neoplasias e uso de quimioterapia, indivíduos que fazem uso de medicamentos genotóxicos ou que tenha tido exposição à radiação terapêutica ou ocupacional.

Toda a metodologia empregada no presente projeto encontra-se de forma esquemática na figura 11.

Figura 11: Organograma resumo das metodologias utilizadas neste estudo.



3.2. COLETA DE DADOS E OBTENÇÃO DE AMOSTRAS

Foram utilizadas alíquotas de células de medula óssea de 90 casos de trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos oriundos da Região da Chapada do Apodi, em Limoeiro do Norte (a 200 km de Fortaleza - CE). As amostras encontravam-se estocadas em soluções de Trizol Reagente® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) a -80°C.

As amostras de medula óssea que foram utilizadas como controle celular neste estudo foram obtidas a partir de 20 doadores saudáveis e voluntários com idades próximas as do grupo amostral.

As variáveis que foram analisadas neste estudo (Apêndice B) foram subdivididas em:

- Sexo: Masculino e Feminino;
- Idade;
- Subgrupo de cultivo: Grande Produtor, Pequeno Produtor e Agricultura Ecológica.

Hábitos de Vida:

- Uso de Bebidas Alcoólica: Sim ou Não;
- Tipo de Bebida Preferida: Cachaça, Cerveja, Vinho, Conhaque, Rum, Vodka e outros;
- Uso do Fumo: Sim ou Não;

Caracterização do Trabalho:

- Quantos anos de trabalho na agricultura: Menos de 1 ano, de 01 a 04 anos, de 05 a 08 anos, de 08 a 12 anos, mais de 12 anos e não sei;

Caracterização da Exposição do Trabalhador:

- No seu trabalho, você tem algum contato com agrotóxicos? Sim, Não ou Não sei.
- Qual o tipo de contato que você tem com esses agrotóxicos? Direto (durante a atividade de trabalho), indireto (após aplicação, colheita, muda e outros) e durante a pulverização aérea.

- Quais os agrotóxicos (veneno) que você tem contato? Bayfidan EC, Bórax, Bravonil 500, Carbofuran, Cercobin 500SC, Cobre Atar BR, Comet, Cuprozeb, Domark 100EC, Finale, Flare, Folicur 200 CE, Fugiscan 700WP, Garant, Gramocil, Gramoxone 200, Ícarus, Impact125SC, Juno 250CE, Manzate 800, Metiltiofan, Mythos, Nativo, Opera, Opus SC, Orius 250EC, Roundup, Score, Scout NA, Soprano 125SC, Soprano 25EC, Stratego 250EC, Sulfato de Cobre, Support, Tango Cash, Tecto SC, Tilt, Triade, Triazol, Vistue e outros.

- Casos seja da agricultura familiar, a quanto tempo trabalha com essa forma de cultivo? Meses, anos e não sei informar.

- Qual a frequência em que você entra em contato com os agrotóxicos (veneno)? Diárias (horas/dia), semanal (dia/semana), mensal (semana/mês), anual (meses/ano) e não sei informar.

- Quanto tempo você trabalhou com esses agrotóxicos? Menos de 1 ano, de 1 a 4 anos, de 5 a 8 anos, de 8 a 12 anos, mais de 12 anos ou outros.

Medidas de controle do risco adotados pelo trabalhador:

- Qual(ais) desta(s) medida(s) de prevenção você adota em seu trabalho? Luvas, máscaras, lenço, óculos, chapéu, botas, macacão, observação dos ventos, banho após trabalho ou nenhuma proteção.

- Onde são lavadas as roupas que você usa no trabalho? Em casa, na empresa ou não respondeu.

- O que é feito com as embalagens vazias dos produtos químicos (Agrotóxicos) usados na empresa em que você trabalha? Queima, enterra, reutiliza, armazena, devolve ao vendedor, vai para unidade de tratamento de embalagens (UTE) ou não sei.

Cariótipo:

- Cariótipo Normal para o subgrupo: Grande Produtor, Pequeno Produtor e Agricultura Ecológica.

- Cariótipo Alterado para o subgrupo: Grande Produtor, Pequeno Produtor e Agricultura Ecológica.

- Ausência de Resultado para o subgrupo: Grande Produtor, Pequeno Produtor e Agricultura Ecológica.

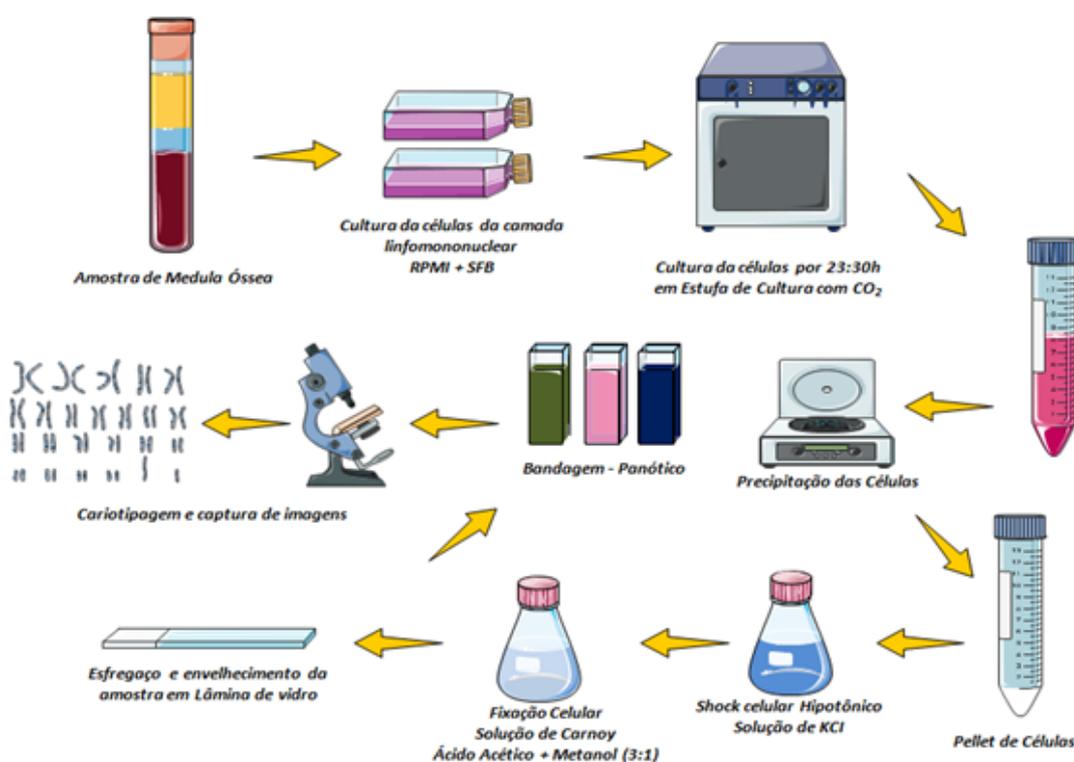
3.3. Cariótipo por Bandeamento G

Os cariótipos foram realizados de acordo com o protocolo adaptado e estabelecido pelo Laboratório de Citogenômica do Câncer, segundo a descrição previa feita por Pinheiro e Chauffaille (2009) (Figura 12). A Citogenética Clássica por bandeamento G foi realizada utilizando-se de 3mL medula óssea colhida em seringa contendo heparina e de forma estéril, posteriormente a amostra foi distribuída em dois frascos contendo 7 mL de meio RPMI (Ph 7,0) e 3mL de soro fetal bovino. Este material foi cultivado por 24 horas em estufa a 37°C.

Uma hora antes do término da cultura foram adicionados 70uL de colchicina (Colcemid®), por 30 minutos. Em seguida, o material foi centrifugado e ressuspenso em solução hipotônica de KCL 0,075 M e fixado em solução de ácido acético e metanol (3:1) por 4 vezes. Na 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, 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 digitalizado e impresso em impressora a laser.

Figura 12: Esquema detalhado dos procedimentos quem compõem a técnica de Citogenética Clássica por Bandeamento G.



3.4. Lise de Células Eritrocitárias para Armazenamento em TRIZOL LS A -8°C

Para a preservação de ácidos nucleicos e proteínas, a medula óssea será transferida para tubo cônico de 50 mL. Será adicionado à medula 25mL de solução de lise, permanecendo em banho de gelo durante 15 minutos. Em seguida, centrifugar a amostra a 3000rpm durante 10 minutos, posteriormente, descartar o sobrenadante por inversão do tubo. Ressuspender a camada de células leucocitárias em 250uL de PBS e 750 uL de trizol e armazenar a -80°C para posterior extração de RNA.

3.5. Análise da Expressão do mRNA por QRT-PCR

3.5.1. Extração de RNA Total

A extração de RNA das células do *pool* medular dos trabalhadores rurais e dos controles foi realizada a partir da utilização do Trizol LS Reagente® de acordo com o protocolo pelo fabricante. Para cada 10⁶ 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. A qualidade das amostras de RNA foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio e as bandas de RNA 18S e 28S foram visualizadas em luz ultravioleta.

3.5.2. 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*TM 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 adicionadas 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.

3.5.3. Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) em Tempo Real – PCR Quantitativa (qPCR) para Análise de Expressão Gênica.

A quantificação da expressão gênica dos sete genes avaliados neste estudo (Tabela 3) 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. 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*® e contendo a *AmpliTaq Gold* DNA polimerase, os dNTPs e tampão otimizados.

Tabela 3: Genes avaliados por qPCR envolvidos nos mecanismos de reparo em DSBs no DNA.

GeneBank	Símbolo	Nomenclatura	Mecanismo de Reparo	TaqMan Assay
NM_000051	ATM	Ataxia telangiectasia mutated	Sinalização por DSB	Hs 01112344_ml
NM_007294	BRCA1	Breast cancer 1, early onset	Supressor Tumoral e Reparo por HR	Hs01556191_m1
NM_000059	BRCA2	Breast câncer 2, early onset	Supressor Tumoral e Reparo por HR	Hs01037423_ml
NM_002875	RAD51	RAD51 recombinase	Reparo por HR	Hs00947967_m1
NM_021141	XRCC5	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 5	Reparo por NHEJ	Hs 00897854_ml
NM_001469	XRCC6	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 6	Reparo por NHEJ	Hs00750856_s1
NM_001469	LIG4	Ligase IV, DNA, ATP-dependent	Reparo por NHEJ	Hs00934061_ml
NC_000012.12	UBC	Ubiquitin C	Gene Endógeno	Hs00824723_ml
NC_000007.14	ACTB	Actin Beta	Gene Endógeno	Hs99999903_ml
NC_000023.11	HPRT1	Hypoxanthine Phosphoribosyl Transferase 1	Gene Endógeno	Hs02800695_ml

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 μL . Para cada reação foram utilizados 5,0 μL de TaqMan PCR Master Mix, 0,5 μL de sonda *TaqMan assay*[®] e 2,5 μL 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 μL 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 indivíduos saudáveis voluntários.

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 ΔCq tanto dos genes alvos quanto dos genes endógenos (LIVAK et al, 2001). A nomenclatura padrão utilizada para os experimentos da PCR quantitativa em tempo real foi baseada no MIQE

(*Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*) (BUSTIN et. al., 2009).

3.5.4. Validação dos Genes Endógenos Utilizados nas Análises dos Dados de qPCR

Com o objetivo de validar a estabilidade dos níveis de expressão dos genes utilizados como controles endógenos nos experimentos de qPCR (PFAFFL, 2001; LIVAK, 2001), foi utilizado o software *Best Keeper* (PFAFFL, 2004) que possibilitou a identificação estatística dos genes endógenos mais estáveis dentre todos os genes utilizados no estudo como endógenos. O *Best Keeper*, é uma ferramenta baseada em Excel na qual é possível calcular o desvio padrão de cada amostra por gene avaliado com base nos valores de *Cq* (PFAFFL, 2004). As amostras cujo o desvio for menor será reconhecida com as amostras correspondentes ao gene mais estável.

Para esse estudo, obtivemos como os genes mais estáveis o *Hypoxanthine Phosphoribosyl Transferase 1* (HPRT1) e a *Ubiquitina* (UBC).

3.5.5. Validação da Qualidade, Integridade e Estabilidade do Nível de Expressão das Amostras de cDNA dos Trabalhadores Avaliados

Afim de garantir a veracidade das análises realizadas após a reação de qPCR e assegurar a qualidade, integridade e estabilidade do nível de expressão das amostras dos trabalhadores rurais, é necessário avaliar os dados com valores em *outliers* das amostras por meio do software *Best Keeper* (PFAFFL, 2004).

O software *Best Keeper* determina o desvio padrão de cada amostra por cada gene em estudo com base em valores brutos de *Cq*, independentemente da eficiência da amostra (PFAFFL, 2004). As amostras de cada gene com o menor SD é considerada a mais estável.

3.6. Análise Estatística

3.6.1. Análises Estatísticas para a Avaliação dos Dados de Expressão Gênica

As análises dos resultados dos níveis de expressão gênica foram realizadas com base no valor de cada *Cq* (quantitative cycle), para cada amostra de cDNA. Na etapa de normalização dos valores, considerando as diferenças por quantidades distintas de cDNA utilizadas nas reações, o *Cq* determinado para uma amostra foi subtraído da média geométrica dos *Cq*'s dos genes endógenos (*UBC* e *HPRT1*) utilizados da mesma amostra, obtendo assim o valor de ΔCq (LIVAK et al, 2001; SCHMITTGEN; LIVAK, 2008).

O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para verificar se os dados de cada variável analisada apresentavam distribuição normal (dados paramétricos, com grupos com menos de 50 casos). Os valores de *outliers* foram retirados (quando ocorreram) por não representarem aqueles resultados aos quais o estudo tinha o objetivo de generalizar (p-valor >0.05 para o teste de Shapiro-Wilk).

Os dados paramétricos foram analisados através do teste *t* de Student, para a comparação da média entre dois grupos, e do teste de ANOVA, 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-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-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-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 ΔCq) 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 o software SPSS para Windows (versão 21.0).

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização da População

Participaram do presente estudo 90 trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos, moradores de comunidades do município de Limoeiro do Norte – CE, e 10 voluntários saudáveis para o grupo controle (Tabela 4). O grupo amostral de agricultores foi subdividido em três faixas: o grande produtor com 50/90 (55,55%) indivíduos, o pequeno produtor (agricultura familiar) com 30/90 (33,33%) indivíduos e a agricultura ecológica com 10/90 (11,11%) indivíduos.

Quanto aos critérios sócio demográficos dos trabalhadores rurais, observou-se que para a variável gênero obtivemos 2/90 (2,22%) indivíduos do sexo feminino e 88/90 (97,77%) indivíduos do sexo masculino. Para a variável idade, a média foi de 44 anos (mediana = 44 anos/ mínimo de 22 anos e máximo de 69 anos) com uma predominância de idade dos trabalhadores com 54 anos.

Tabela 4: Caracterização descritiva das variáveis sócio demográficas dos trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos (DSBs).

Variáveis	Caracterização		Frequência
	Categoria		
Amostras (N =100)	Trabalhadores rurais		90,0% (90/100)
	Caso controle		10,0 % (10/100)
Grupos	Grande produtor		55,55% (50 /90)
	Pequeno produtor (agricultura familiar)		33,33% (30/90)
	Agricultura ecológica		11,11% (10/90)
Gênero	Masculino		97,77% (88/90)
	Feminino		2,22% (2/90)
Idade Média = 44 Anos Moda =54 Anos Mediana = 44 Anos	≤ 44 Anos		48,88%(44/90)
	> 44 Anos		45,55%(41/90)
	Não informado		5,55% (5/90)

Em relação aos hábitos de vida dos agricultores, na variável exposição a agrotóxico estão inclusos os trabalhadores pertencentes ao grupo de grande produtor e pequeno produtor, onde 9/80 (11,25%) indivíduos possuem menos de 5 anos de exposição, 5/80 (6,25%) indivíduos entre 5 a 12 anos de exposição e 61/80 (76,25%) indivíduos como tempo de 12 a mais anos de trabalho com exposição a tóxicos.

Quanto a variável uso de bebidas alcoólicas, indicou que 36/90 (40%) dos trabalhadores não bebem e que 49/90 (54,44%) fazem uso de bebidas, sendo a cachaça com 32/48 (66,6%) a mais comum. Já para a variável fumo, foi avaliado dentre os trabalhadores que 68/90 (75,55%) não fazem uso de cigarro e 16/90 (17,77%) dos trabalhadores fumam (Tabela 5).

Tabela 5: Caracterização descritiva dos hábitos de vida dos trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos.

Hábitos de vida		Frequência
Variáveis	Categorias	
Tempo de exposição a agrotóxico	Menos de 5 anos de exposição	11,25% (9/80)
	De 5 a 12 anos de exposição	6,25% (5/80)
	De 12 anos ou mais	76,25% (61/80)
	Não informado	6,25% (5/80)
Álcool	Bebem	54,44% (49/90)
	Não bebem	40% (36/90)
	Não informado	5,55% (5/90)
Tipo de bebida	Cachaça	66,6% (32/48)
	Cerveja	62,5% (30/48)
	Vinho	6,25% (3/48)
	Conhaque	4,16% (2/48)
	Rum	4,16% (2/48)
Fumo	Fumam	17,77% (16/90)
	Não fumam	75,55% (68/90)
	Não informado	6,66% (6/90)

Os dados sobre caracterização da exposição ao agrotóxico no trabalho, obtivemos que todos os trabalhadores que participaram da pesquisa fazem uso ou entram em contato com

agrotóxico na agricultura, com exceção dos agricultores que praticam agricultura ecológica. Arelada a está variável foi possível constatar também que 36/80 (45%) possuem contato direto durante a atividade de trabalho com agrotóxico, sendo o trabalho na área de pulverização a principal atividade de trabalho apresentada, e 27/80 (33,75%) possuem contato indireto. Analisamos também os tipos mais usados de agrotóxicos pelos trabalhadores rurais e obtemos que o tóxico Round como o mais utilizado com 10/80 (12,5%) (Tabela 6).

Tabela 6: Caracterização descritiva da exposição dos trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos.

Caracterização da exposição no trabalho		Frequência
Variáveis	Categorias	
Exposição a agrotóxicos no trabalho	Uso/contato com agrotóxico	88,88% (80/90)
	Não possui contato	11,11% (10/90)
Tipo de contato com agrotóxico	Direto	45% (36/80)
	Indireto	33,75% (27/80)
	Não informado	21,25% (17/80)
Principal atividade exercida	Trabalho na área de pulverização	36,25% (29/80)
	Pulverização costal	25% (20/80)
Quais os agrotóxicos mais utilizados	Roundup	12,5% (10/80)
	Gramoxone 200	6,25 % (5/80)
	Folicur 200CE	3,75 % (3/80)
	Tecto 250 EC	3,75 % (3/80)
	Orius 250 EC	2,5 % (2/80)
	Fugiscan 700WP	2,5 % (2/80)

Os dados relacionados as medidas de controle de risco adotados pelos trabalhadores, variável cuja função é averiguar o uso de EPIs no trabalho, foram que 44/80 (55%) indivíduos que utilizam luvas, 26/80 (32,5%) indivíduos que usam máscaras, 19/80 (23,75%) indivíduos que usam óculos de proteção, 25/80 (31,25%) e 65/80 (81,25%) indivíduos que usam macacão e bota, respectivamente.

Além de tais dados, obtivemos que, para a variável de onde são lavadas as roupas utilizadas no trabalho, obtivemos que 63/80 (78,76%) lavam em casa, enquanto que 9/80

(11,25%) trabalhadores lavam no trabalho. E quanto a variável descarte de embalagens dos produtos químicos, temos que 12/80 (15%) queima, 5/80 (6,25%) enterra, 4/80 (5%) reutiliza, 11/80 (13,75%) armazena, 3/80 (3,75%) devolve ao vendedor, 2/80 (2,51%) descarta em unidades de tratamento de embalagens (UTI) e 43/80 (53,75%) não responderam (Tabela 7).

Tabela 7: Medidas de controle de risco adotadas pelos trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos.

Medidas de controle de risco		Frequência
Variáveis	Categorias	
Uso de EPIs	Luvas	55% (44/80)
	Máscaras	32,5% (26/80)
	Óculos de proteção	23,75% (19/80)
	Chapéu	88,75% (71/80)
	Botas	81,25% (65/80)
	Macacão	31,25% (25/80)
Lavagem em casa de roupas utilizados no trabalho	Sim	78,76% (63/80)
	Não	11,25% (9/80)
O que é feito com as embalagens vazias dos produtos químicos	Queima	15% (12/80)
	Enterra	6,25% (5/80)
	Reutiliza	5% (4/80)
	Armazena	13,75% (11/80)
	Devolve ao vendedor	3,75% (3/80)
	Unidade de tratamento de embalagens (UTE)	2,5% (2/80)
	Não respondeu	53,75% (43/80)

A análise citogenética dos trabalhadores rurais, demonstrou resultados de cariótipo normal em 15/90 (16,6%) para grupo grande produtor, 6/90 (6,6%) para o pequeno produtor e 7/90 (7,7%) para agricultura ecológica. O resultado de citogenética foi alterado em 8/90 (8,8%) do grupo grande produtor, 3/90 (3,3%) do grupo de pequeno produtor e 1/90 (1,1%) do grupo agricultura ecológica (Tabela 8, Tabela 9 e Figura 13).

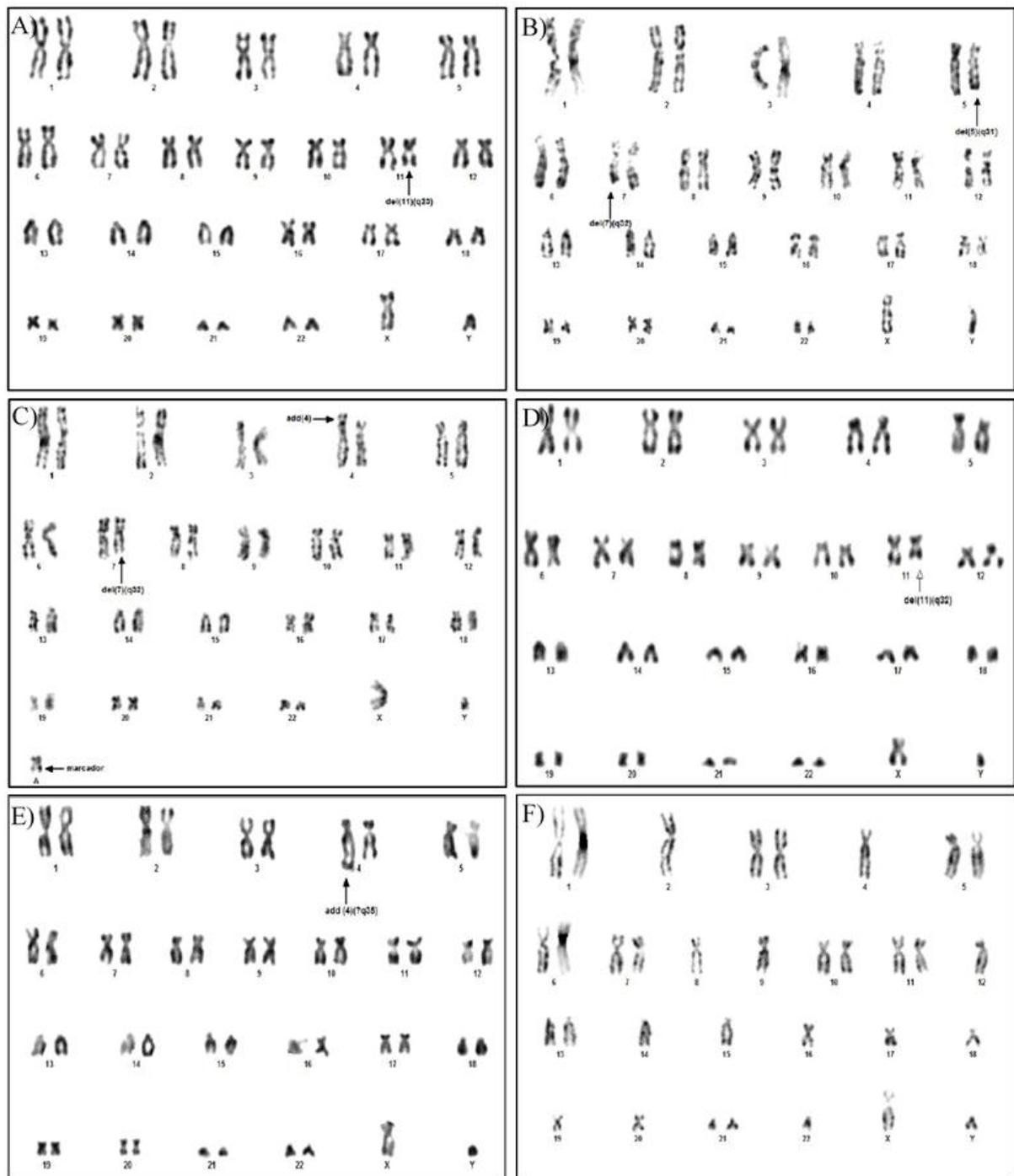
Tabela 8: Caracterização dos cariótipos de acordo com os grupos de trabalhadores rurais.

Resultado Cariótipo	Grupos de trabalhadores rurais	Frequência
Normal	Grande produtor	16,6%(15/90)
	Pequeno produtor (Agricultura familiar)	6,6%(6/90)
	Agricultura ecológica	7,7%(7/90)
Alterado	Grande produtor	8,88%(8/90)
	Pequeno produtor (Agricultura familiar)	3,33%(3/90)
	Agricultura ecológica	1,1%(1/90)
Ausência de metáfase	Grande produtor	30%(27/90)
	Pequeno produtor (Agricultura Familiar)	23,3%(21/90)
	Agricultura ecológica	2,22%(2/90)

Tabela 9: Descrição detalhada dos resultados citogenéticos normais e alterados por cada grupo de trabalhador rural.

ID	Sexo	Idade	Cariótipo - ISCN 2014	Grupo
3	M	25	46,XY[20]	GP
7	M	34	46,XY[15]	GP
10	M	29	46,XY[20]	GP
14	M	33	46,XY[11]	GP
16	M	31	46,XY[20]	GP
17	M	52	46,XY[30]	GP
19	M	53	46,XY,add(4)	GP
20	M	48	46,XY[7]	GP
21	M	25	46,XY[6]	GP
22	M	49	Hipodiploide - 44,XY,-20,-21[8]46,XY[2]	GP
26	M	43	46,XY[15]	GP
29	M	43	46,XY,del(11)[5]	GP
30	M	25	46,XY[20]	GP
35	M	34	46,XY,add(4)/46,XY[15]	GP
38	M	28	46, XY [10]	GP
39	M	51	46, XY [10]	GP
40	M	54	Hiperdiploide	GP
41	M	62	Hipodiploide	GP
42	F	41	46,XX,del(18)(p11.21)[4]/46,XX[22]	GP
44	M	36	46,XY[10]	GP
45	M	64	46,XY[5]	GP
49	M	60	46,XY(del11)	GP
51	M	50	46,XY[10]	AF
58	M	49	46,XY[20]	AF
61	M	45	46,XY[10]	AF
62	M	53	47,XYmar(4)	AF
65	M	42	Hipodiploide	AF
67	M	54	46,XY[7]	AF
70	M	34	46,XY[20]	AF
73	M	46	Hipodiploide	AF
74	M	57	46,XY[20]	AF
80	M	60	46,XY[25]	AE
82	M	43	46,XY(del5)	AE
84	M	32	46,XY[15]	AE
85	M	59	46, XY [4]	AE
86	M	53	46,XY[20]	AE
87	M	56	46,XY[17]	AE
88	M	40	46,XY[7]	AE
89	M	27	46,XY[20]	GP

Figura 13: Representação esquemática dos resultados citogenéticos a partir de amostras de medula óssea de trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos.



Legenda: A) Caso 25 com deleção no braço longo do cromossomo 11; B) Caso 8 revela a deleção do braço longo do cromossomo 5 e deleção do braço longo do cromossomo 7; C) Caso 19 revela a deleção do braço longo do cromossomo 4, além da presença de um cromossomo marcador; D) Caso 43 revela a deleção do braço longo do cromossomo 11; E) Caso 29 revela material adicional no cromossomo 4; F) Caso 42 revela hipodiploidia.

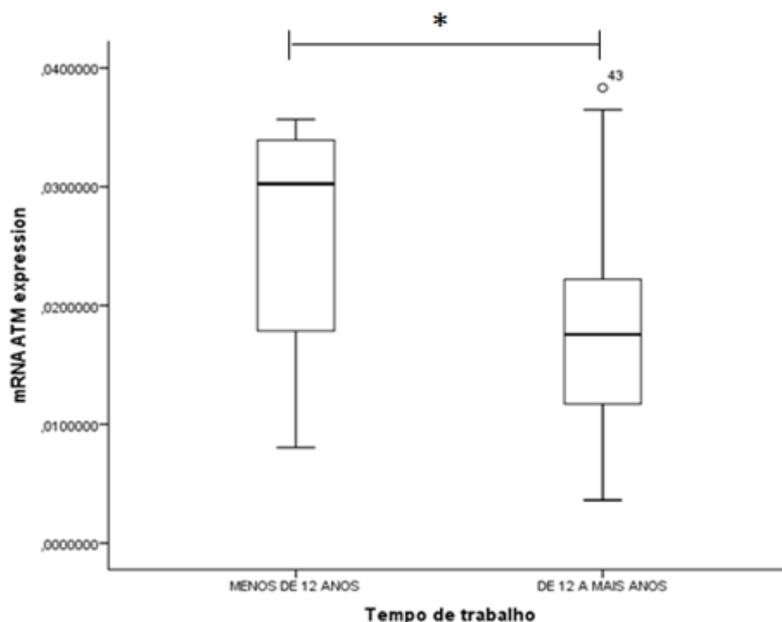
4.2. Análise do nível de expressão gênica por QPCR em amostras de *pool* celular da medula de agricultores expostos a agrotóxicos.

A análise dos níveis de expressão gênica referente aos genes *ATM*, *BRCA1*, *BRCA2*, *XRCC5*, *XRCC6*, *LIG4* e *RAD51* de trabalhadores rurais em associação com os indivíduos controles, as respectivas variáveis de caracterização do estudo, e os resultados citogenéticos serão apresentados nas seções a seguir.

4.2.1. Análise dos níveis de expressão do gene *ATM*.

O nível de expressão do gene *ATM*, que está localizado no braço longo do cromossomo 11 na posição 11q22-q23, apresentou associação significativa com relação à variável tempo de trabalho, a qual identificamos que a expressão do gene encontra-se reduzida nos trabalhadores com 12 ou mais anos quando comparado com os trabalhadores com menos de 12 anos de trabalho ($p=0,030$) (Figura 14).

Figura 14: Nível de expressão do gene *ATM* em relação ao tempo de trabalho em contato com agrotóxico dos trabalhadores rurais.



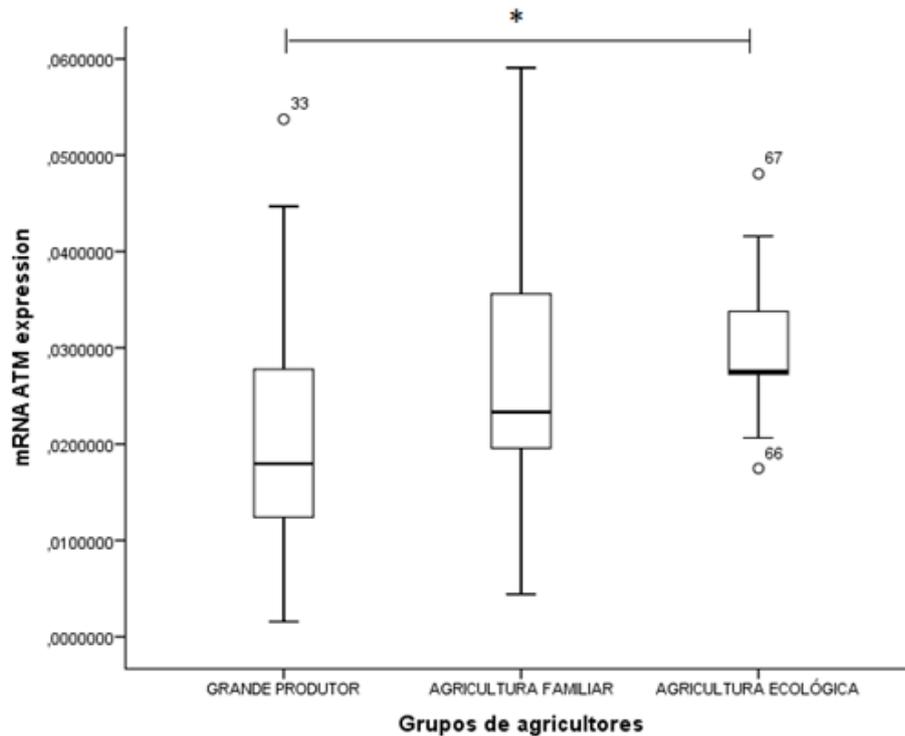
		Nível de Expressão (ΔCq)							
		N	%	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	Teste de Levene	p-valor†
Tempo de Trabalho	Menos de 12 anos	11	91,7%	0,02536	0,01004	0,00804	0,03567	0,328	0,030
	De 12 a mais anos	38	84,4%	0,01833	0,00890	0,00361	0,03833		

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

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

Na análise do nível de expressão do gene *ATM* em relação a variável grupos de agricultores, obtivemos que o gene se encontra superexpresso em trabalhadores da agricultura ecológica em relação aos trabalhadores do grupo grande produtor ($p=0,036$) (Figura15).

Figura 15: Nível de expressão do gene *ATM* em relação variável grupo de agricultores, categorizada em grande produtor, pequeno produtor e agricultura ecológica.



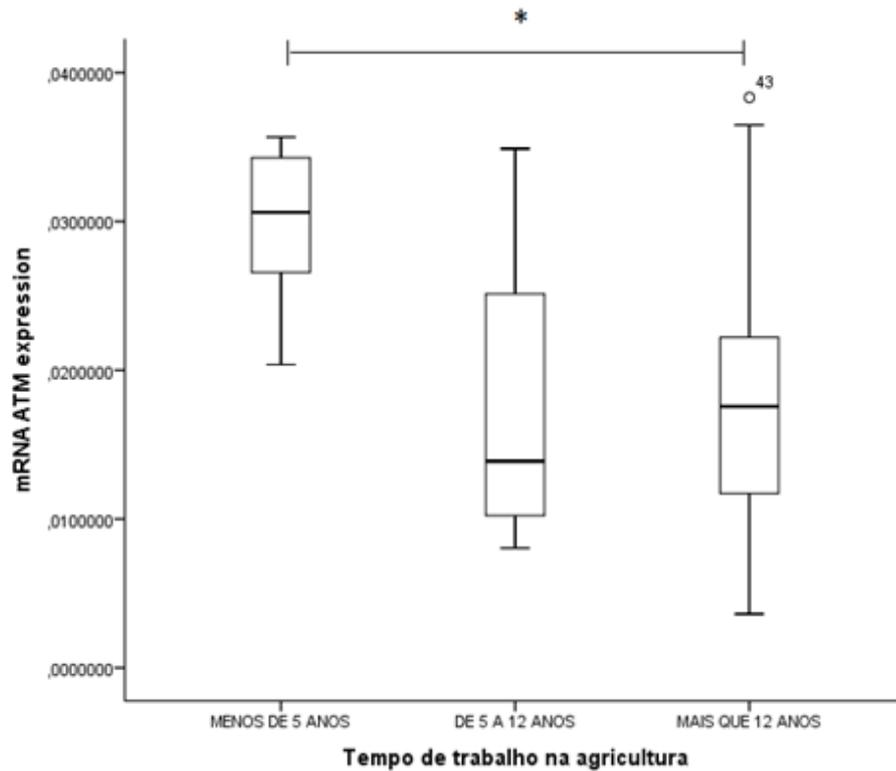
		Nível de Expressão (ΔCq)								
		N	%	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	ANOVA†	Teste de Levene	Games-Howell <i>post-hoc</i> test
Grupos de Agricultores	Grande Produtor	37	94,9%	0,020	0,011	0,001	0,053	0,020	0,464	0,036*
	Agricultura Familiar	23	100%	0,027	0,013	0,004	0,059			-
	Agricultura Ecológica	9	100%	0,030	0,009	0,017	0,048			0,036*

† ANOVA one-way. Teste de Levene - Teste de homogeneidade de variâncias.

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

Por fim, para a variável tempo de trabalho a expressão deste gene foi reduzida no período de 12 anos em relação ao período menor de 5 anos de trabalho ($p=0,003$) (Figura 16).

Figura 16: Nível de expressão do gene *ATM* em relação variável tempo de trabalho na agricultura.



		Nível de Expressão (ΔCq)								
		N	%	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	ANOVA [†]	Teste de Levene	Games-Howell <i>post-hoc</i> test
Tempo de trabalho na agricultura	Menos de 5 anos	7	87,5%	0,029	0,005	0,020	0,035	0,010	0,457	0,003*
	De 5 a 12 anos	4	100%	0,017	0,011	0,008	0,034			-
	Mais de 12 anos	38	84,4%	0,018	0,008	0,003	0,038			0,003*

[†] ANOVA one-way. Teste de Levene - Teste de homogeneidade de variâncias.

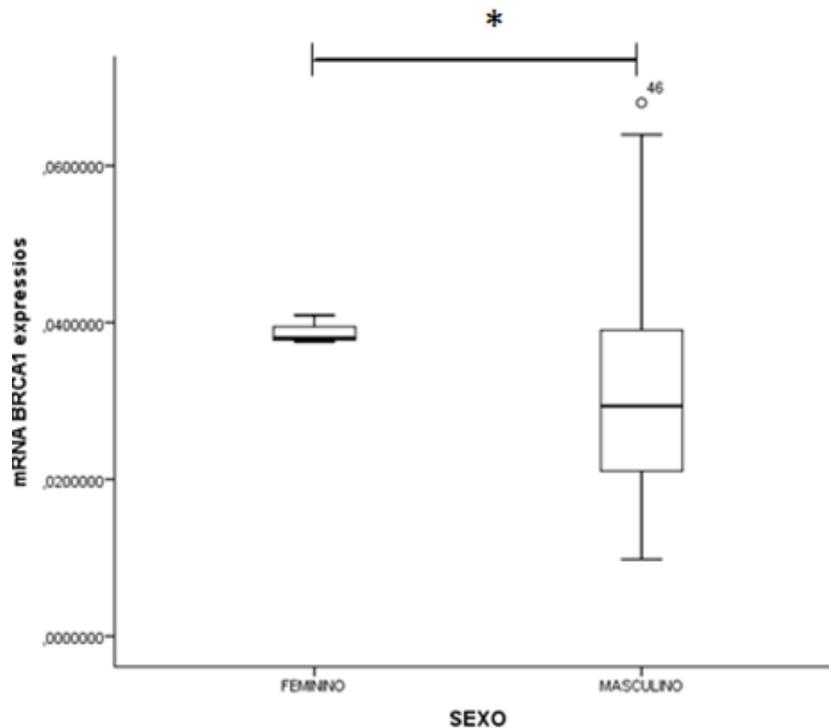
Valor estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$.

Não foram identificadas associações significantes entre o nível de expressão do gene *ATM* e as variáveis sexo, cariótipo, grupos que usam agrotóxicos, álcool, fumo, contato com agrotóxico, tipo de contato e EPIs (luvas, máscaras, lenço, chapéu, botas e macacão), com o $p > 0,05$.

4.2.2. Análise dos níveis de expressão do gene *BRCA1*

O nível de expressão do gene *BRCA1*, que está localizado no braço longo do cromossomo 17 na região 17q21, apresentou associação do nível de expressão com a variável sexo, onde o nível de expressão de *BRCA1* se encontra reduzido no sexo masculino ($p=0,002$) (Figura 17).

Figura 17: Nível de expressão do gene *BRCA1* em relação variável sexo dos trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos.



		Nível de Expressão (ΔCq)							
		N	%	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	Teste de Levene	p-valor†
Sexo	Feminino	3	100%	0,03883	0,0018	0,03755	0,06803	0,48	0,002*
	Masculino	65	95,6%	0,03153	0,0140	0,00980	0,06803		

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

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

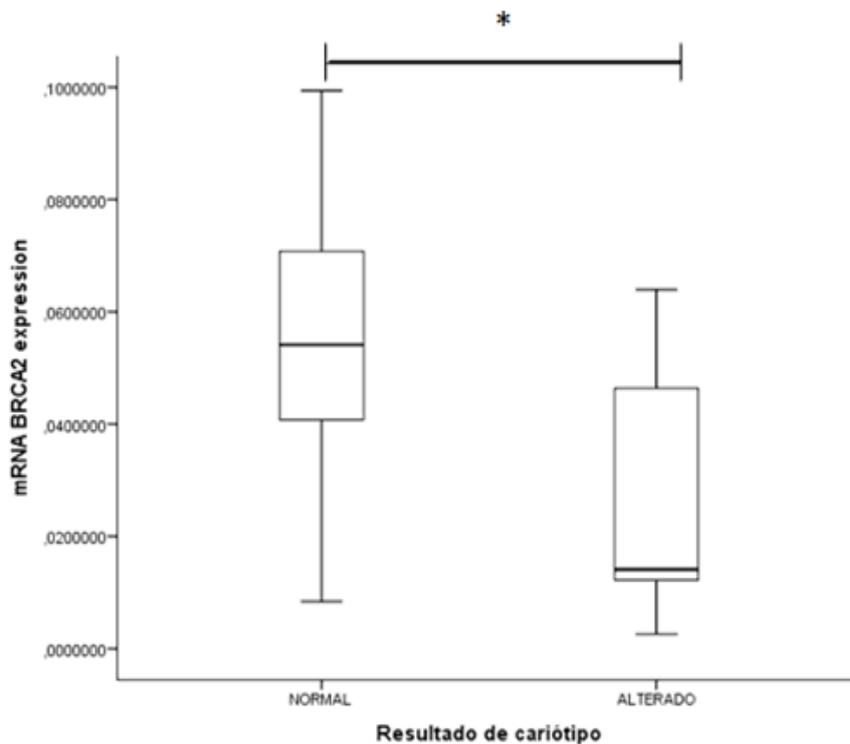
Não foram identificadas associações significantes entre o nível de expressão do gene *BRCA1* e as demais variáveis grupo agricultores, tempo de trabalho, cariótipo, grupos que usam agrotóxicos, álcool, fumo, contato com agrotóxico, tipo de contato e EPIs (luvas, máscaras, lenço, chapéu, botas e macacão), com o $p > 0,05$.

4.2.3. Análise dos níveis de expressão do gene *BRCA2*

Para o gene *BRCA2*, que está localizado no braço longo do cromossomo 13 na região 13q12.3, verificou-se importantes associações em relação ao nível de expressão deste gene e as variáveis cariótipo e local aonde são lavadas as roupas de trabalho.

Para a variável resultado de cariótipo, a expressão do gene se encontrava reduzida quando o cariótipo alterado em relação a expressão quando o cariótipo é normal em trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos ($p=0,007$) (Figura 18).

Figura 18: Nível de expressão do gene *BRCA2* em relação variável resultado de cariótipo.

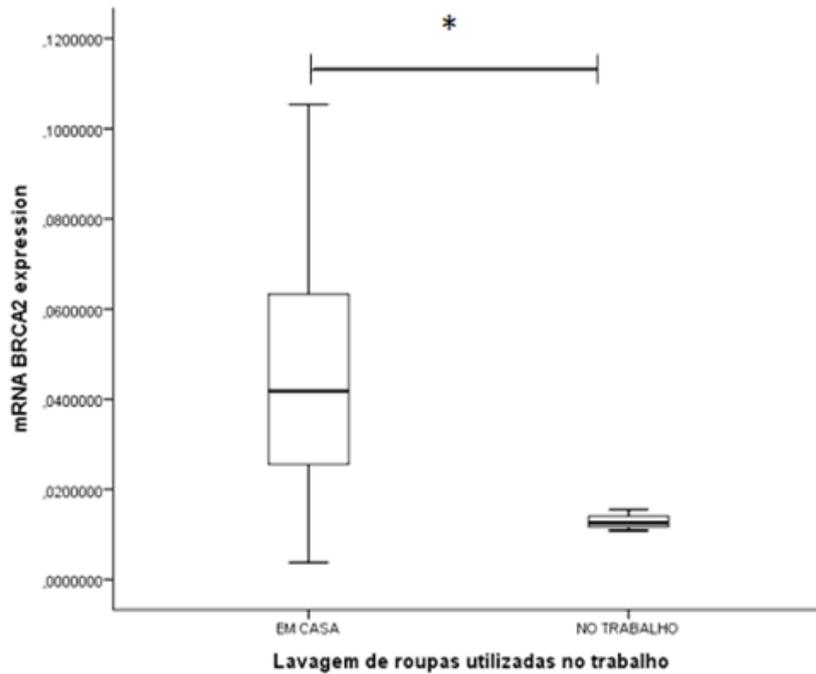


		Nível de Expressão (ΔCq)							
		N	%	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	Teste de Levene	p-valor†
Cariótipo	Normal	20	100%	0,05479	0,02312	0,00835	0,09938	0,830	0,007*
	Alterado	8	88,9%	0,02649	0,02270	0,00257	0,06396		

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

Em relação a variável local aonde são lavadas as roupas de trabalho, obtivemos que quando as roupas são lavadas no trabalho há uma redução da expressão do gene em relação à quando são lavadas em casa, com a significância é de $p=0,000$ (Figura 19).

Figura 19: Nível de expressão do gene BRCA2 em relação variável local aonde são lavadas as roupas dos trabalhadores rurais.



		Nível de Expressão (ΔCq)							
		N	%	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	Teste de Levene	p-valor†
Local de lavagem de roupas de trabalho	Casa	49	98%	0,04502	0,02476	0,01088	0,01552	0,027	0,00*
	Trabalho	3	60%	0,01300	0,00234	0,00379	0,10539		

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

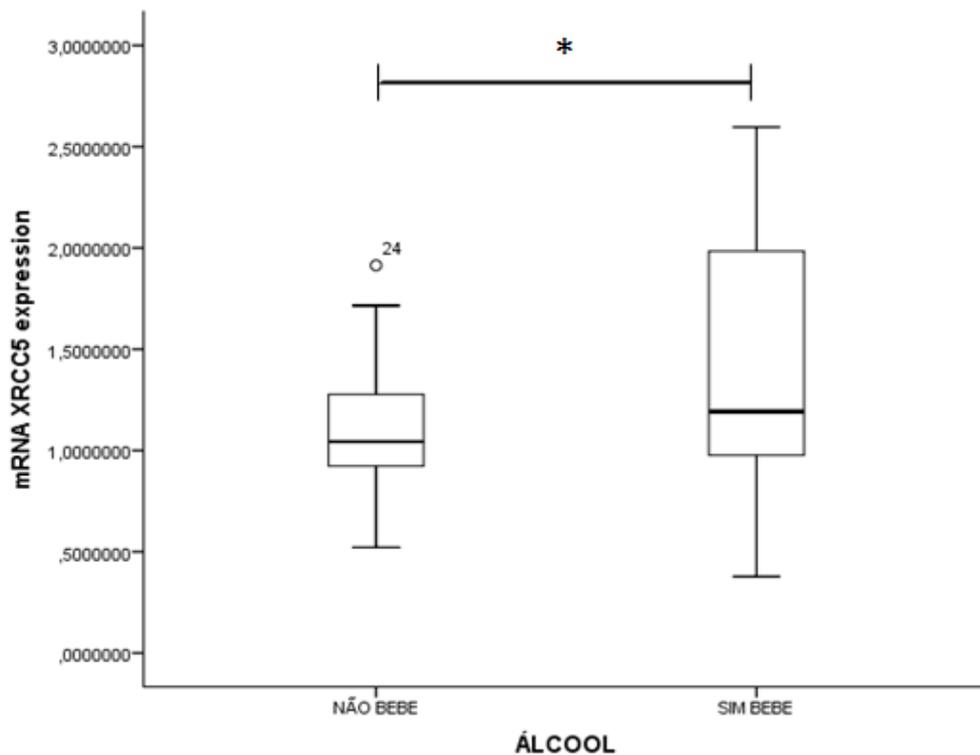
Valor estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$.

Não foram identificadas associações significantes entre o nível de expressão do gene *BRCA2* e as demais variáveis grupo agricultores, tempo de trabalho, sexo, grupos que usam agrotóxicos, álcool, fumo, contato com agrotóxico, tipo de contato e EPIs (luvas, máscaras, lenço, chapéu, botas e macacão), com o $p > 0,05$.

4.2.4. Análise dos níveis de expressão do gene *XRCC5*

O gene *XRCC5*, que está localizado no cromossomo 2 na região 2q33.2-36.1, apresenta o nível de expressão aumentada para a variável consumo de álcool em relação aos trabalhadores que não consomem ($p=0,012$) (Figura 20).

Figura 20: Nível de expressão do gene *XRCC5* em relação variável consumo de álcool.



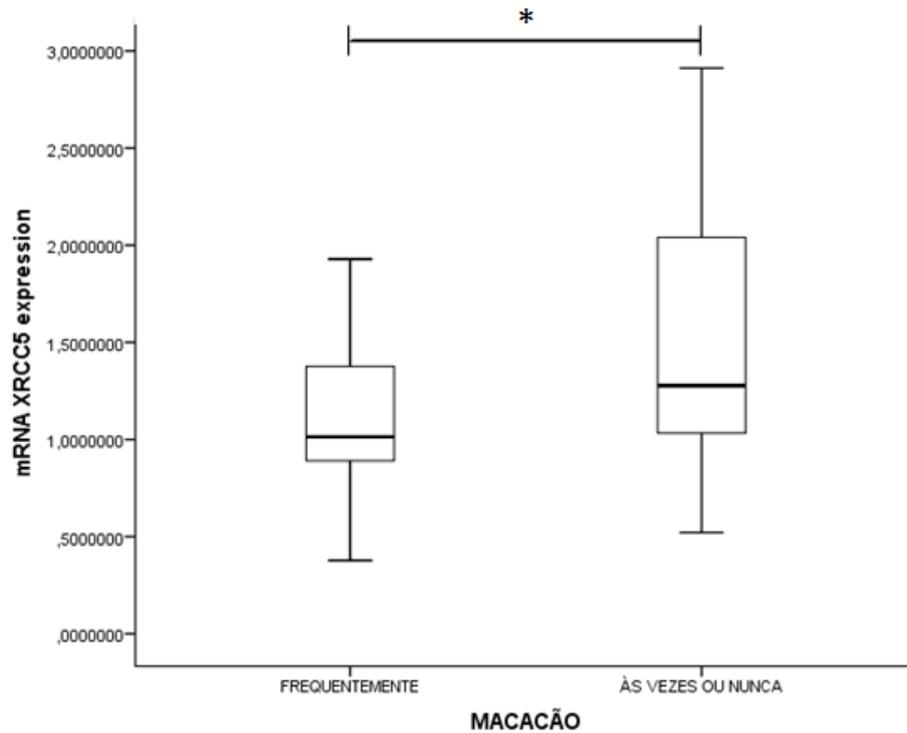
		Nível de Expressão (ΔCq)							Teste de Levene	p-valor†
		N	%	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo			
Consumo de Álcool	Não bebe	22	88%	1,09218	0,3313	0,52113	1,91401	0,000	0,012*	
	Sim bebe	32	100%	1,43681	0,6322	0,37707	2,59680			

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

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

Para a variável uso de macacão, uma subclassificação dos EPIs analisados, o nível de expressão do gene *XRCC5* está reduzido em trabalhadores que usam o macacão frequentemente ($p=0,021$) (Figura 21).

Figura 21: Nível de expressão do gene XRCC5 em relação variável uso de macacão (EPIs).



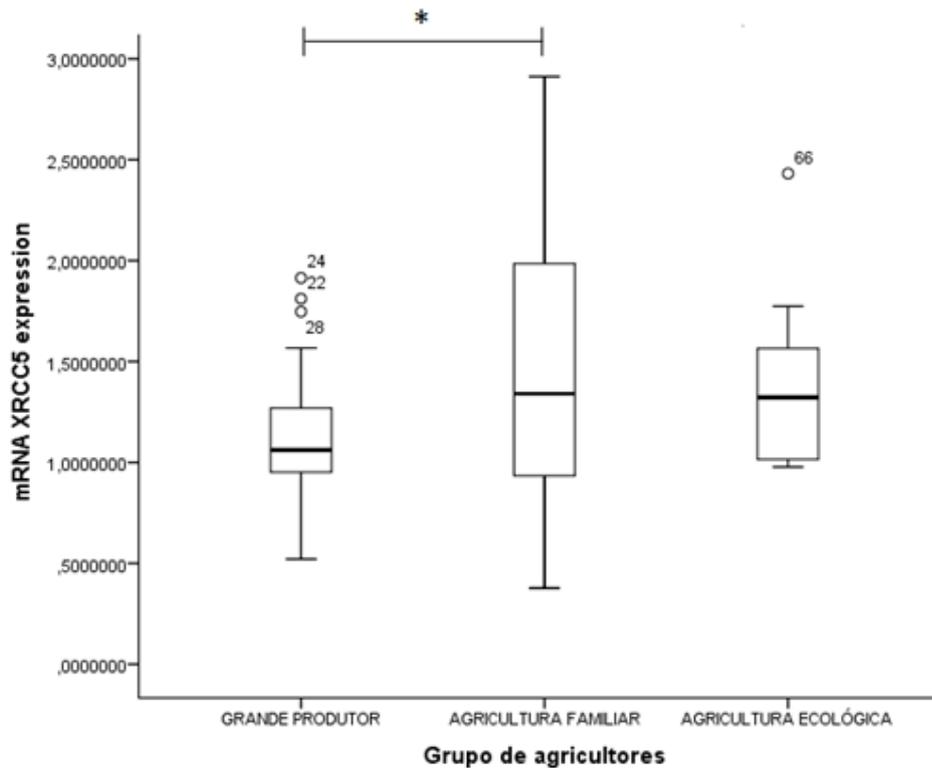
		Nível de Expressão (ΔCq)							Teste de Levene	p-valor†
		N	%	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo			
Uso de Macacão (EPIs)	Frequentemente	18	90%	1,11162	0,37858	0,37707	1,92814	0,008	0,021*	
	Às vezes ou nunca	29	100%	1,46900	0,64572	0,52113	2,91188			

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

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

Na análise da variável grupos de trabalhadores, obtivemos que a expressão do gene *XRCC5* encontra-se aumentada quando comparamos agricultura familiar e grande produtor, com a significância de $p = 0,038$ (Tabela 22).

Figura 22: Nível de expressão do gene XRCC5 em relação variável grupos de trabalhadores rurais.



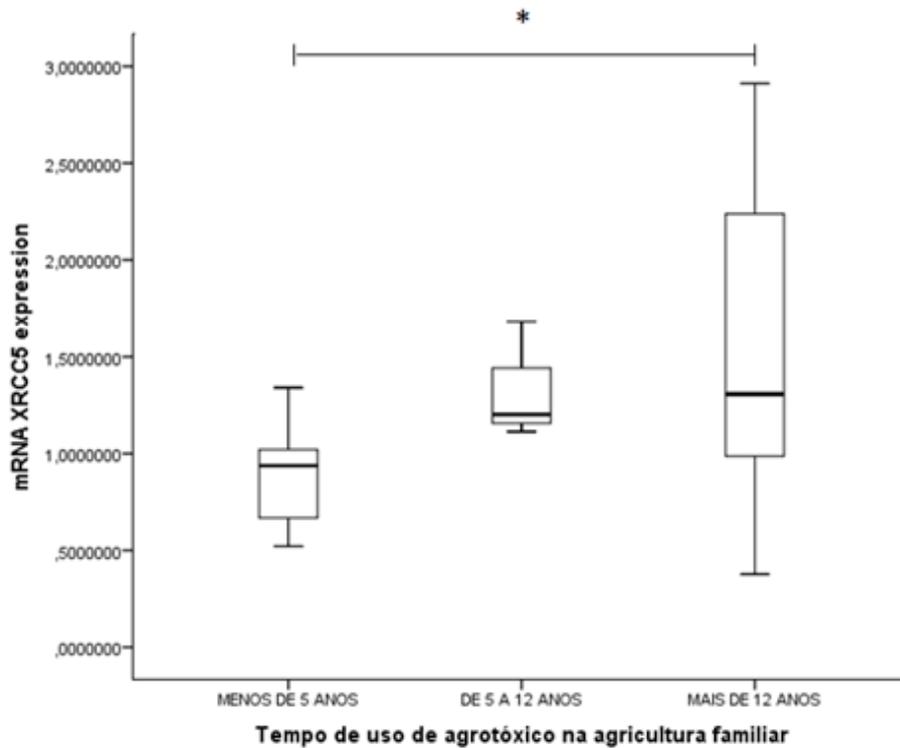
		Nível de Expressão (ΔCq)								
		N	%	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	ANOVA†	Teste de Levene	Games-Howell <i>post-hoc</i> test
Grupos de agricultores	Grande Produtor	34	87,2%	1,1259	0,3097	0,5211	1,9140	0,039	0,000	0,038*
	Agricultura Familiar	23	100%	1,4722	0,7136	0,3770	2,9188			0,038*
	Agricultura Ecológica	8	88,9%	1,4013	0,4922	0,9771	2,4315			-

† ANOVA one-way. Teste de Levene - Teste de homogeneidade de variâncias.

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

Por fim, a variável tempo de uso de agrotóxico na agricultura familiar, a expressão do gene está aumentada no período maior que 12 anos em relação ao período menor que 5 anos ($p=0,014$) (Figura 23).

Figura 23: Nível de expressão do gene XRCC5 em relação variável tempo de uso de agrotóxico na agricultura familiar.



		Nível de Expressão (ΔCq)								
		N	%	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	ANOVA†	Teste de Levene	Games-Howell <i>pos-hoc</i> test
Tempo de uso agrotóxicos na agricultura familiar	Menos de 5 anos	10	83,3%	0,883	0,2548	0,5211	1,3406	0,019	0,000	0,014*
	De 5 a 12 anos	3	100%	1,331	0,3053	1,1130	1,6807			-
	Mais de 12 anos	27	100%	1,569	0,7244	0,3770	2,9118			0,014*

† ANOVA one-way. Teste de Levene - Teste de homogeneidade de variâncias.

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

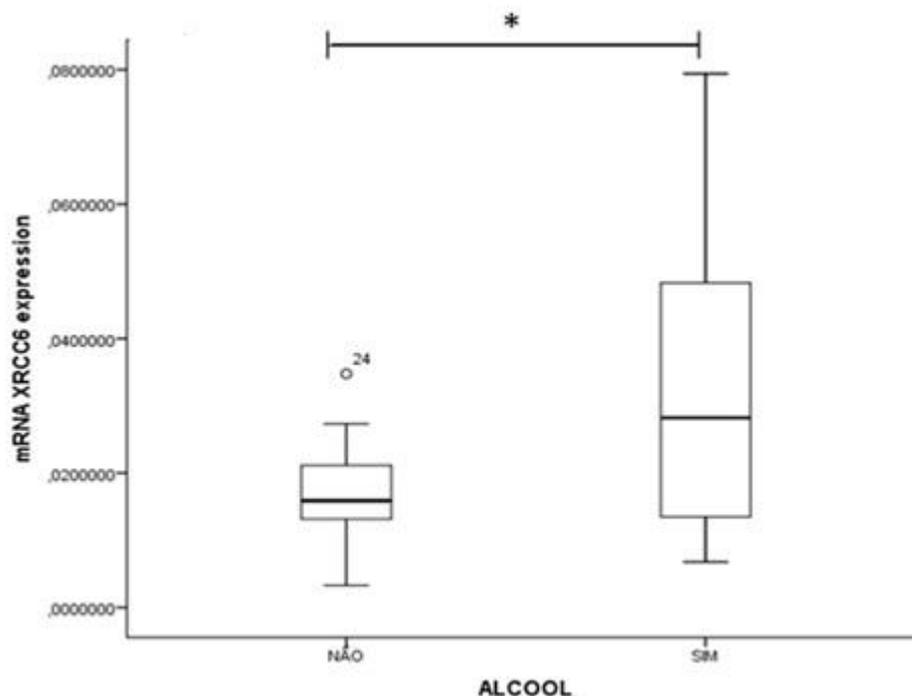
Não foram identificadas associações significantes entre o nível de expressão do gene XRCC5 e as demais variáveis tempo de trabalho, sexo, fumo, contato com agrotóxico, tipo de contato e EPIs (luvas, máscaras, lenço, chapéu e botas), com o $p > 0,05$.

4.2.5. Análise dos níveis de expressão do gene *XRCC6*.

O gene *XRCC6*, que está localizado no cromossomo 22 na região 22q13.2, apresentou importante significância quando a expressão desse gene se encontra associada as variáveis consumo de álcool e tipo de contato do trabalhador com agrotóxico.

Para a variável consumo de álcool, observamos que a expressão de *XRCC6* foi aumentada em trabalhadores rurais que consomem em relação aos trabalhadores que não fazem uso ($p=0,006$) (Figura 24). E para a variável tipo de contato do trabalhador com agrotóxicos, que se categoriza em contato direto (durante a atividade de trabalho) e contato indireto (após aplicação, colheita, muda e outros), obtivemos a expressão do gene reduzida quando os trabalhadores possuíam contato direto em relação aos que possuíam indireto ($p=0,005$) (Figura 25).

Figura 24: Nível de expressão do gene *XRCC6* em relação as variáveis consumo de álcool e tipo de contato do trabalhador com agrotóxico.

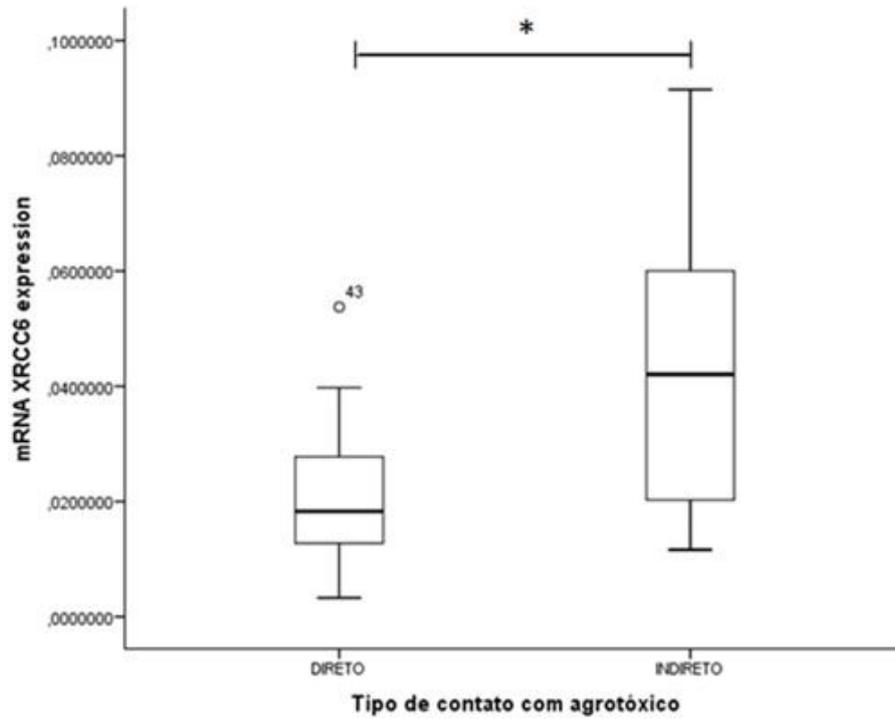


		Nível de Expressão (ΔCq)							
		N	%	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	Teste de Levene	p-valor†
Consumo de Álcool	Não bebe	14	56%	0,03599	0,0492	0,00328	0,20180	0,001	0,015*
	Sim bebe	21	65,6%	0,03764	0,0257	0,00677	0,09685		

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

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

Figura 25: Nível de expressão do gene XRCC6 em relação ao tipo de contato do trabalhador com o agrotóxico.



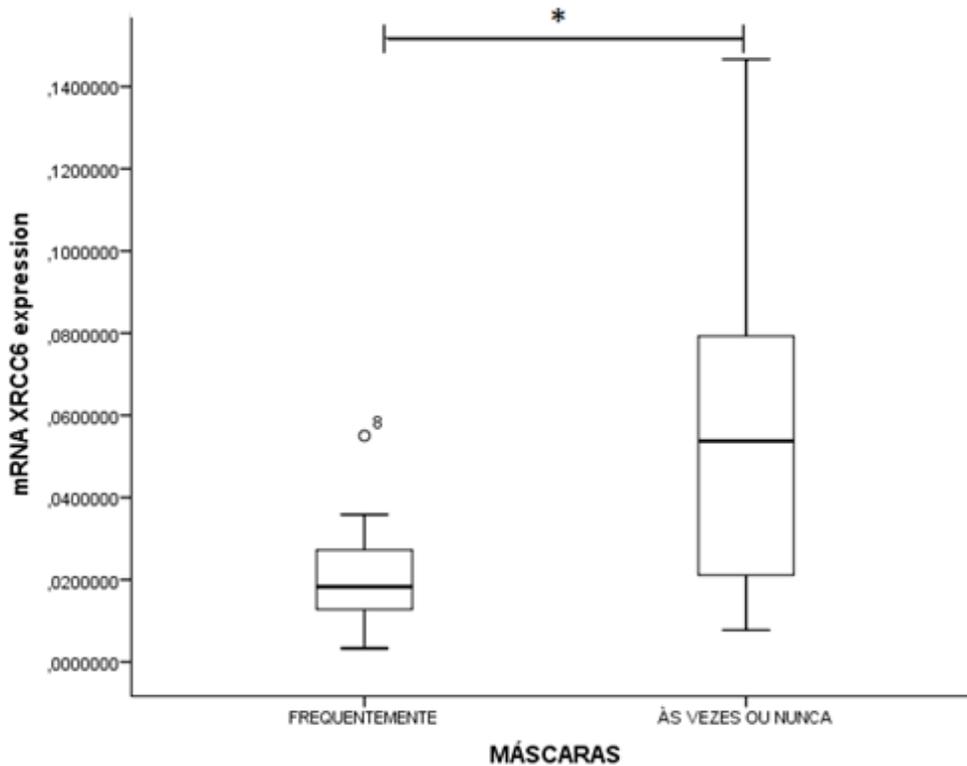
		Nível de Expressão (ΔCq)							
		N	%	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	Teste de Levene	p-valor†
Tipo de contato	Direto	19	73,1%	0,02094	0,01297	0,00328	0,05375	0,002	0,002*
	Indireto	16	80%	0,04282	0,02500	0,01161	0,09149		

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

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

Frente a variável uso de máscara, uma das subclassificações de EPIs, foi possível identificar que a expressão do gene XRCC6 está reduzido quando o uso for frequente ($p=0,000$) (Figura 26).

Figura 26: Nível de expressão do gene XRCC6 em relação variável uso de máscara.



		Nível de Expressão (ΔCq)							
		N	%	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	Teste de Levene	p-valor†
Máscara	Frequentemente	15	78,9%	0,0211	0,0133	0,00328	0,05502	0,001	0,002*
	Às vezes ou nunca	27	79,4%	0,0538	0,0363	0,00771	0,14665		

†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 *XRCC6* e as demais variáveis grupo agricultores, tempo de trabalho, sexo, grupos que usam agrotóxicos, fumo, contato com agrotóxico e EPIs (luvas, lenço, chapéu, botas e macacão), com o $p > 0,05$.

4.2.6. Análise dos níveis de expressão do gene *LIG4*.

O gene *LIG4*, que está localizado no braço longo do cromossomo 13 na região 13q33, apresentou expressão significativa quando associado as variáveis uso de agrotóxico dentre os grupos (grande produtor, agricultura familiar e agricultura ecológica) e quanto a variável fumo.

Para a variável uso de agrotóxico dentre os grupos, obtivemos a expressão do gene *LIG4* reduzida nos grupos que fazem uso de agrotóxicos quando comparado com o grupo que não faz uso ($p=0,002$). Enquanto para variável fumo, obtivemos a expressão do gene aumentada em relação aos trabalhadores que fumam quando comparado com os trabalhadores que não fumam ($p=0,031$) (Figura 27).

Figura 27: Nível de expressão do gene *LIG4* em relação a variável uso de agricultores dentre os grupos e a variável fumo.

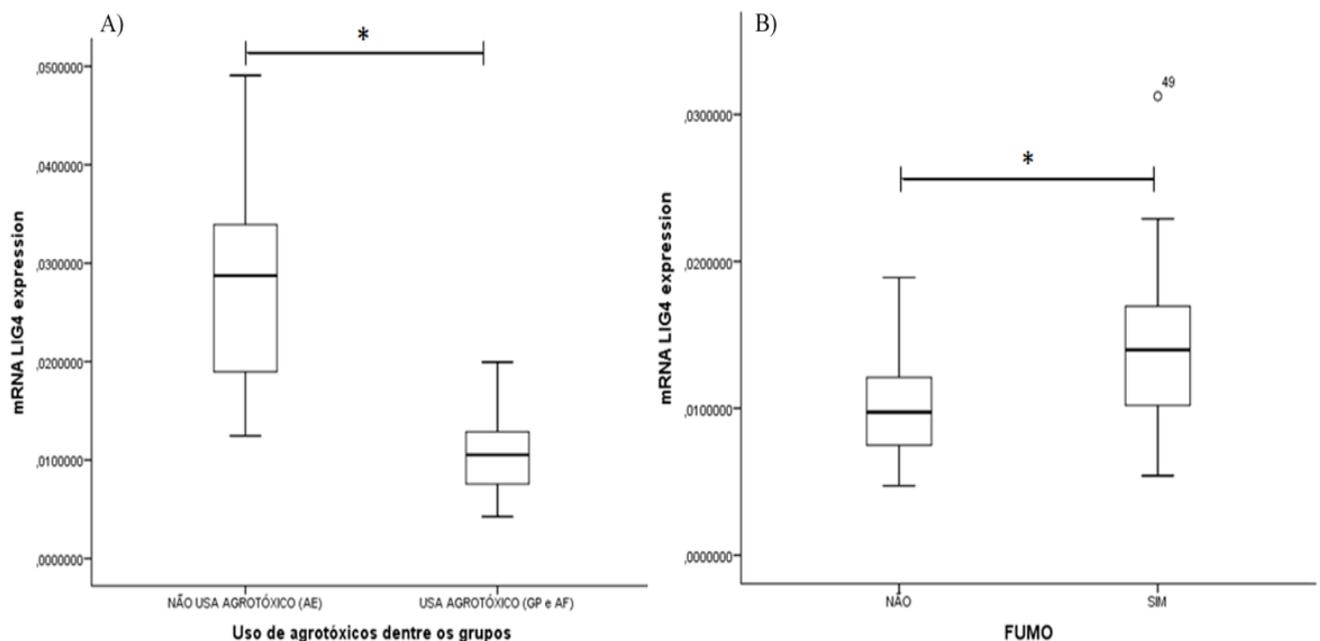


GRÁFICO A		Nível de Expressão (ΔCq)							
		N	%	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	Teste de Levene	p-valor†
Uso de agrotóxicos	Não	9	100%	0,028473	0,01163	0,0124548	0,0490677	0,000	0,000*
	Sim	52	83,9%	0,011632	0,00391	0,0042508	0,0199535		

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

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

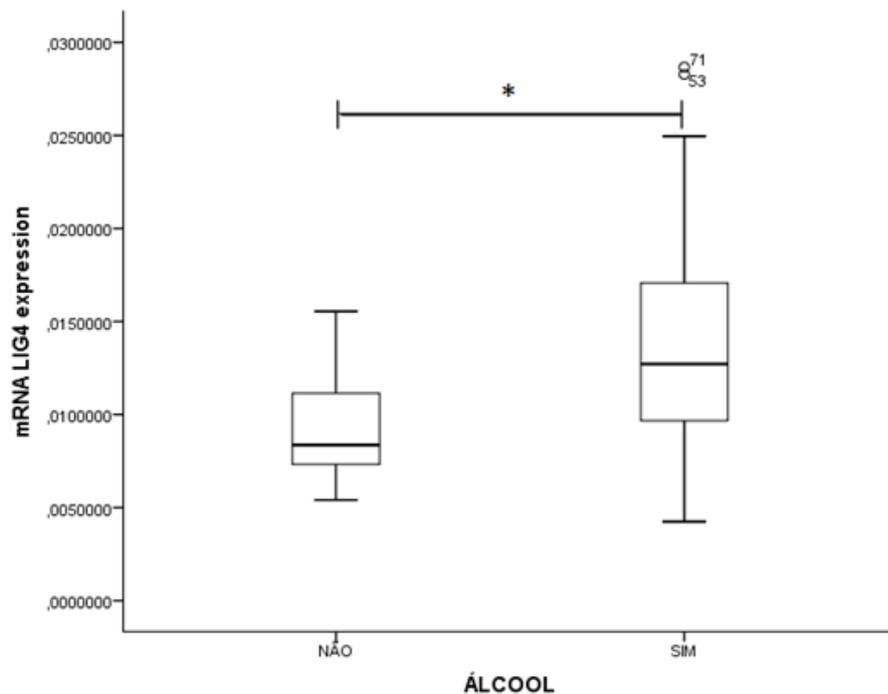
GRÁFICO B		Nível de Expressão (ΔCq)							
		N	%	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	Teste de Levene	p-valor†
Fumo	Sim	34	79,1%	0,01004	0,003	0,0047245	0,0188978	0,009	0,002*
	Não	13	100%	0,01492	0,007	0,0054156	0,0312455		

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

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

Quanto a variável consumo de álcool, a expressão do gene *LIG4* apresentou-se aumentada para os trabalhadores que consomem álcool em relação aos trabalhadores que não fazem uso ($p=0,001$) (Figura 28).

Figura 28: Nível de expressão do gene *LIG4* em relação a variável consumo de álcool.



		Nível de Expressão (ΔCq)							
		N	%	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	Teste de Levene	p-valor†
Álcool	Sim	20	80%	0,01381	0,00641	0,0042508	0,0286703	0,004	0,001*
	Não	31	96,9%	0,00908	0,00270	0,0054156	0,0155421		

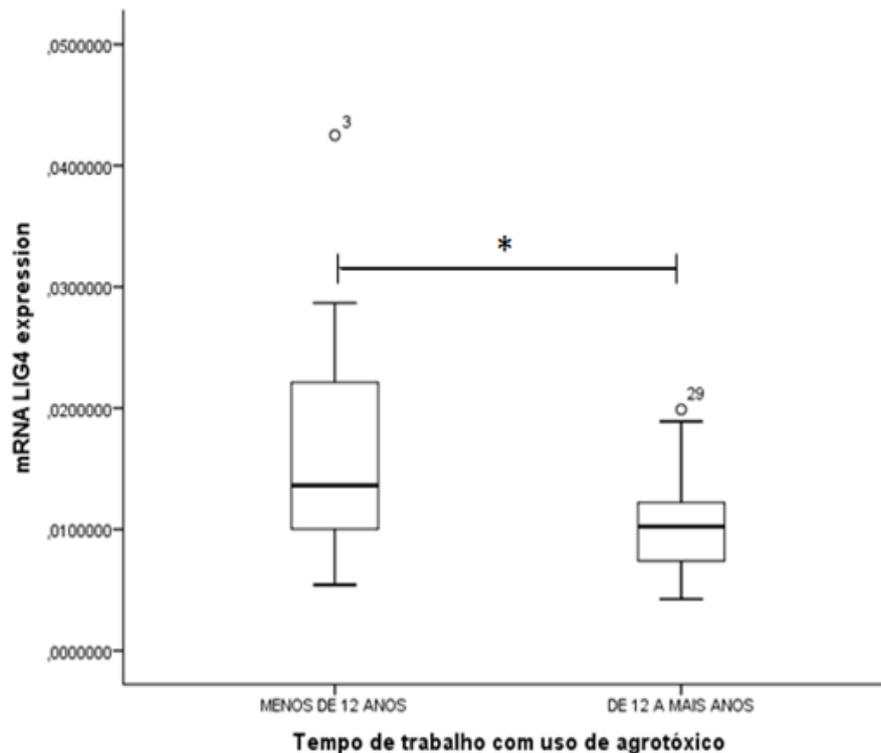
Teste *t de Student*. Teste de Levene - Teste de homogeneidade de variâncias.

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

Para a análise da expressão do gene *LIG4* em associação com a variável tempo de trabalho com uso de agrotóxicos obtivemos a expressão reduzida nos trabalhadores que

relataram de 12 a mais anos em relação aos trabalhadores com o tempo de trabalho menor que 12 anos ($p=0,044$) (Figura 29).

Figura 29: Nível de expressão do gene *LIG4* em relação a variável tempo de trabalho com uso de agrotóxico.



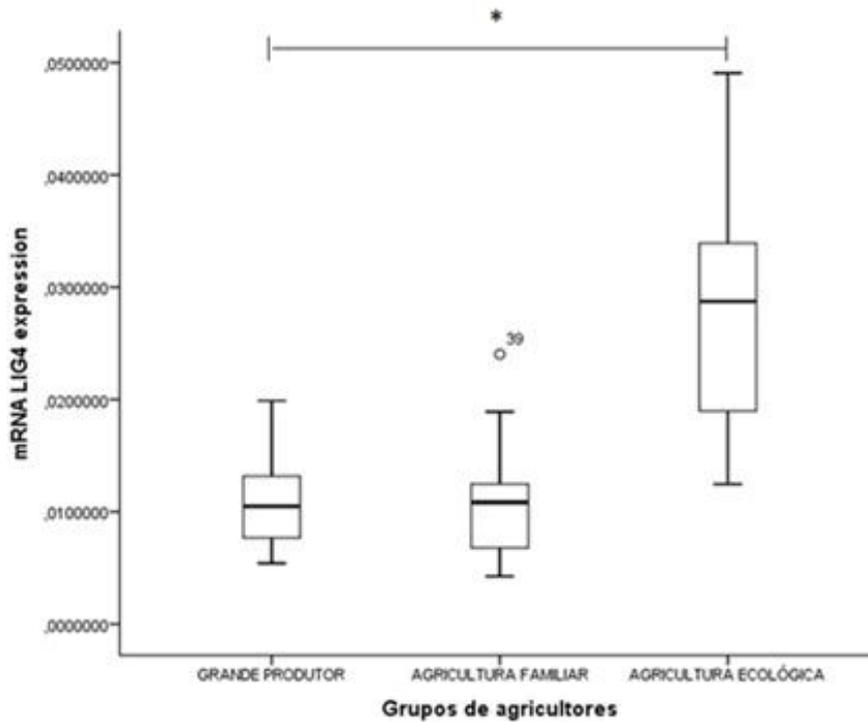
		Nível de Expressão (ΔCq)						Teste de Levene	p-valor†
		N	%	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo		
Tempo de trabalho com uso de agrotóxico	< de 12 anos	12	100%	0,01721	0,01037	0,00541	0,04251	0,000	0,044*
	> de 12 anos	38	84,4%	0,01037	0,00378	0,00425	0,01988		

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

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

Quanto a variável grupo de trabalhadores, verificou-se a expressão reduzida para o grupo grandes produtores quando comparado com o grupo de agricultura ecológica ($p= 0,000$) (Tabela 30).

Figura 30: Nível de expressão do gene LIG4 em relação aos grupos de trabalhadores.

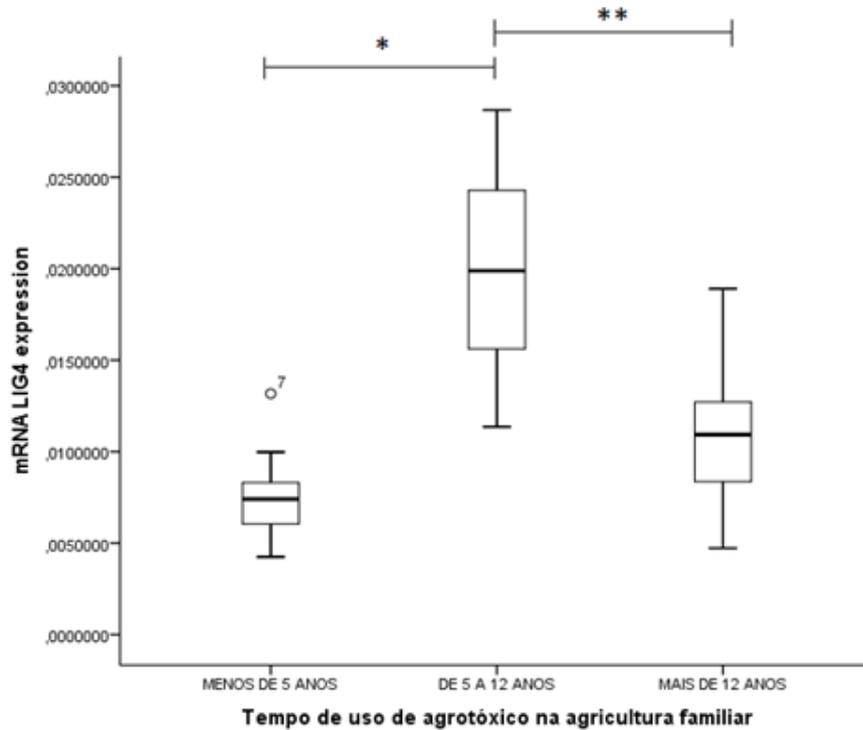


		Nível de Expressão (ΔCq)							ANOVA†	Teste de Levene	Games - Howell <i>pos-hoc</i> test
		N	%	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo				
Grupos de agricultores	Grande Produtor	33	84,6%	0,0108	0,0035	0,0054	0,0198	0,000	0,000	0,000*	
	Agricultura Familiar	19	82,6%	0,0107	0,0050	0,0042	0,0240			-	
	Agricultura Ecológica	9	100%	0,0284	0,0116	0,0124	0,0490			0,000*	

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

Por fim, para a análise da variável tempo de uso de agrotóxicos na agricultura familiar, obtemos a expressão do gene reduzida para o tempo de menos de 5 anos quando comparado com o tempo de 5 a 12 anos ($p=0,000$) e a expressão aumentada para o tempo de 5 a 12 anos quando comparada com o tempo superior a 12 anos ($p= 0,001$) (Figura 31).

Figura 31: Nível de expressão do gene *LIG4* em relação ao tempo de uso de agrotóxico na agricultura familiar.



		Nível de Expressão (ΔCq)								
		N	%	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	ANOVA†	Teste de Levene	Games-Howell <i>post-hoc</i> test
Tempo de uso agrotóxicos na agricultura familiar	Menos de 5 anos	10	83,3%	0,0077	0,0024	0,0042	0,0131	0,000	0,035	0,000*
	De 5 a 12 anos	3	100%	0,0199	0,0086	0,0113	0,0286			0,000* 0,001**
	Mais de 12 anos	23	85,2%	0,0110	0,0034	0,0047	0,0188			0,001**

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

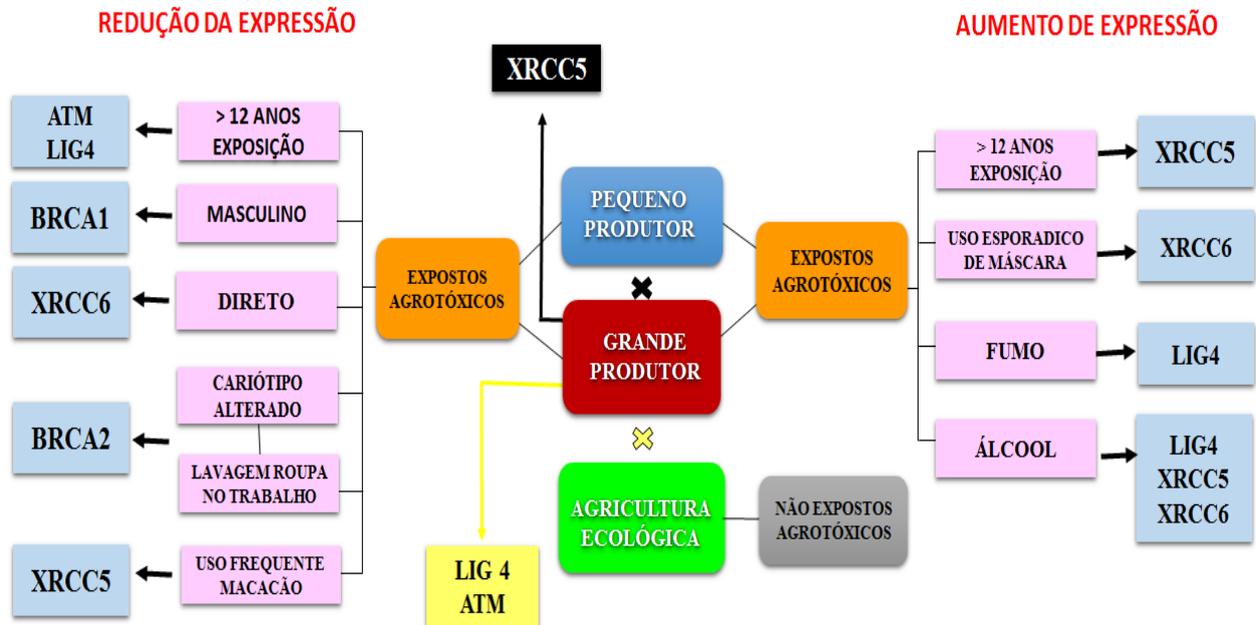
Não foram identificadas associações significantes entre o nível de expressão do gene *LIG4* e as demais variáveis sexo, contato com agrotóxico e EPIs (luvas, lenço, máscara, chapéu, botas e macacão), com o $p > 0,05$.

4.2.7. Análise dos níveis de expressão do gene *RAD51*.

Não foram identificadas associações significantes entre o nível de expressão do gene *RAD51* e as variáveis grupo agricultores, tempo de trabalho, sexo, grupos que usam agrotóxicos, fumo, álcool, tempo de uso de agrotóxicos, contato com agrotóxico e EPIs (luvas, lenço, máscara, chapéu, botas e macacão), com o $p > 0,05$.

Em síntese, as definições dos resultados estão apresentadas de forma esquemática na figura 32.

Figura 32: Representação esquemática dos resultados de expressão gênica deste estudo.



4.3. Análises de correlação entre os níveis de expressão dos genes relacionados aos mecanismos de reparo em danos de fita dupla do DNA.

As análises de correlação entre os genes de reparo de fita dupla do DNA, ocorreu por meio do cálculo da influência da expressão de cada gene sobre a expressão dos demais por meio da análise do teste de correlação de *Pearson* (R) e obtenção do r^2 (*R square*), afim de definir a influência que um gene tem sobre o outro.

Inicialmente, na análise de correlação de *Pearson*, obtivemos uma forte correlação entre os genes BRCA1 e o gene RAD51 ($r=0,770;p<0,000$) e *BRCA1* e *XRCC5* ($r=0,588;p=0,000$), demonstrando que estes genes são responsáveis respectivamente por 59,4% ($r^2=0,594$) e 34,6% ($r^2=0,346$) da variação dos seus respectivos níveis de expressão (Figura 33) (Figura 34).

Figura 33: Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes BRCA1 e RAD51 de trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos.

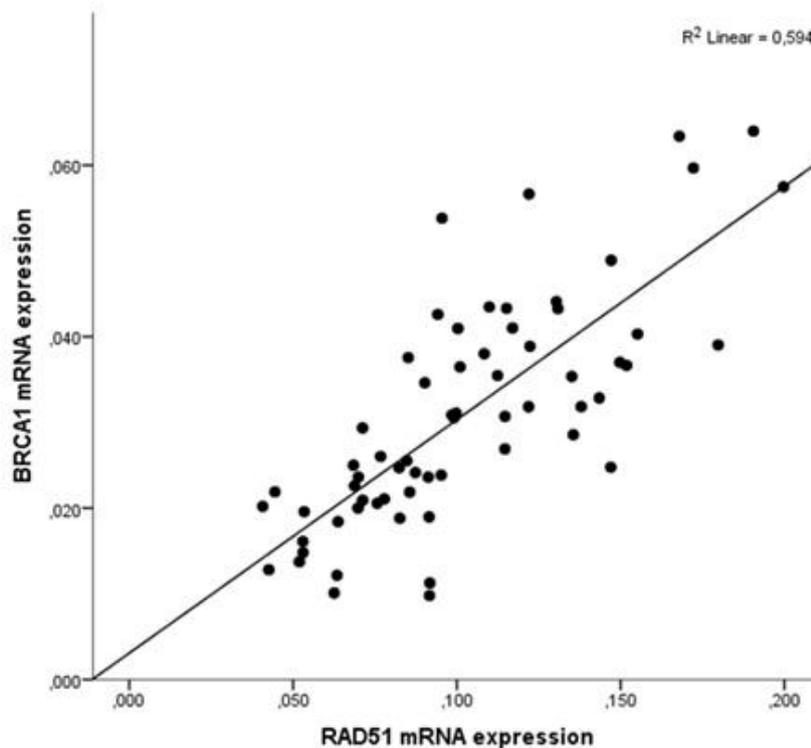
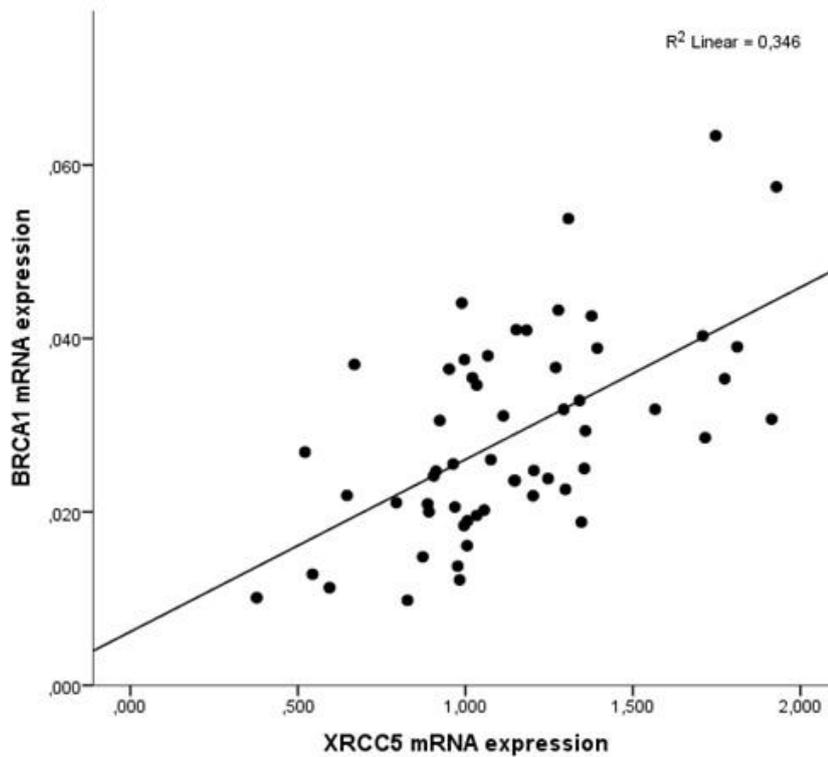


Figura 34: Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes BRCA1 e XRCC5 de trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos.



Em seguida, identificamos que há uma correlação moderada entre os níveis de expressão dos genes *ATM* e *XRCC5* ($r=0,359$; $p=0,007$), *ATM* e *LIG4* ($r=0,383$; $p=0,003$), *BRCA1* e *BRCA2* ($r=0,406$; $p=0,001$), mostrando que esses genes são responsáveis respectivamente por 12,9% ($r^2=0,129$), 14,6% ($r^2=0,146$) e 16,5% ($r^2=0,165$) da variação dos seus respectivos níveis de expressão (Figura 35) (Figura 36) (Figura 37).

Figura 35: Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes ATM e XRCC5 de trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos.

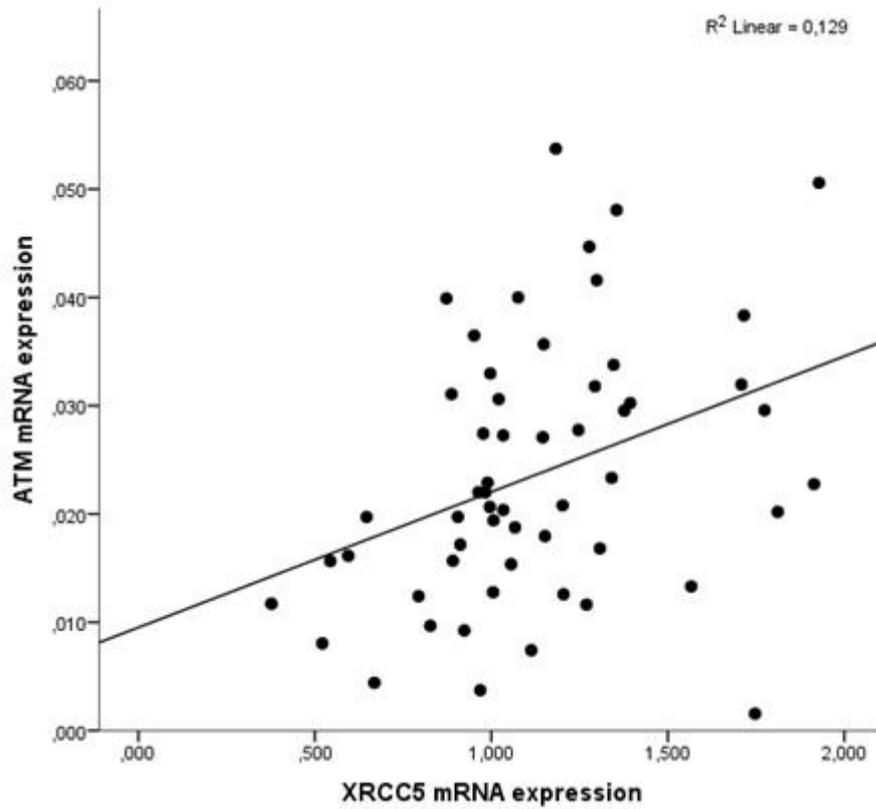


Figura 36: Análise de níveis de expressão dos genes ATM e LIG4 de trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos.

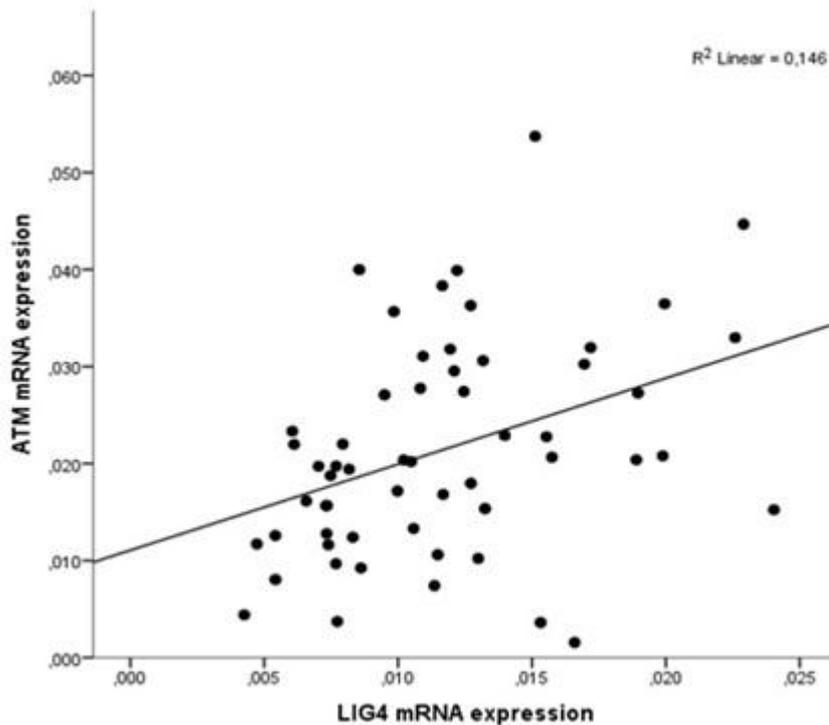
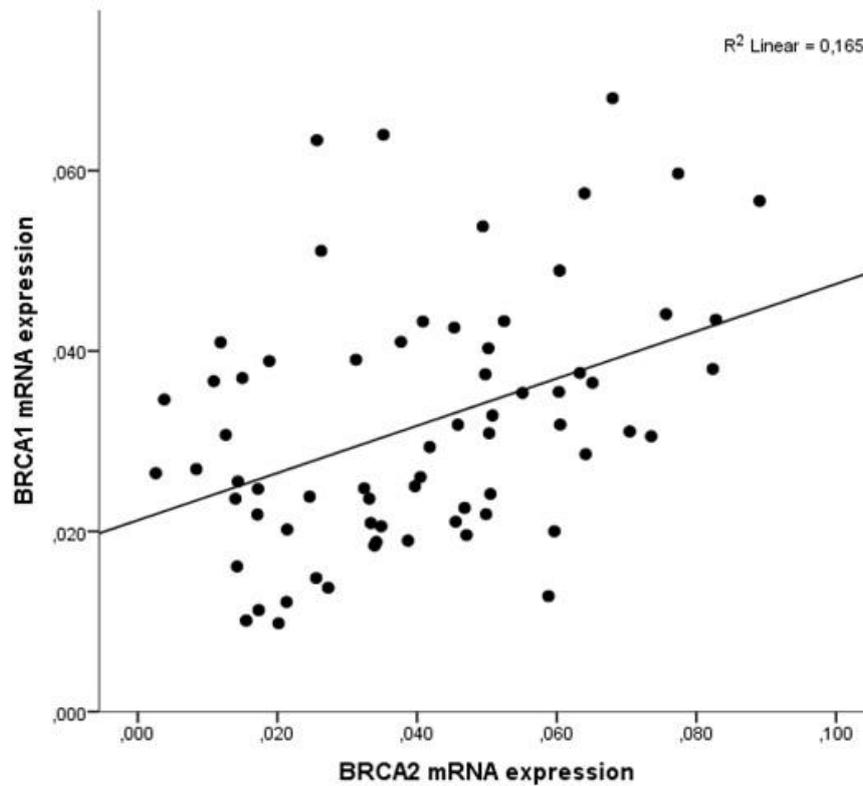


Figura 37: Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes BRCA1 e BRCA2 de trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos.



Adicionalmente, apresentaram ainda correlação moderada nos genes *BRCA1* e *XRCC6* ($r=0,394$; $p=0,002$), *BRCA1* e *LIG4* ($r=0,473$; $p=0,000$) e *XRCC5* e *LIG4* ($r=0,427$; $p=0,002$), mostrando que estes genes são responsáveis por 15,5% ($r^2=0,155$), 22,4% ($r^2=0,224$) e 18,2% ($r^2=0,182$) da variação dos seus respectivos níveis de expressão em trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos (Figura 38) (Figura 39) (Figura 40).

Figura 38: Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes BRCA1 e XRCC6 de trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos.

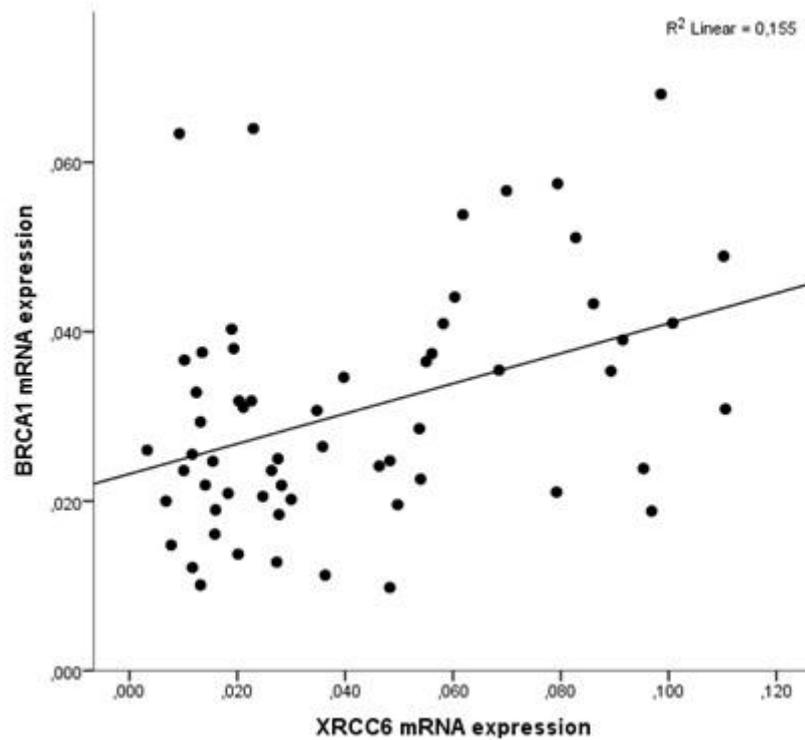


Figura 39: Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes BRCA1 e LIG4 de trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos.

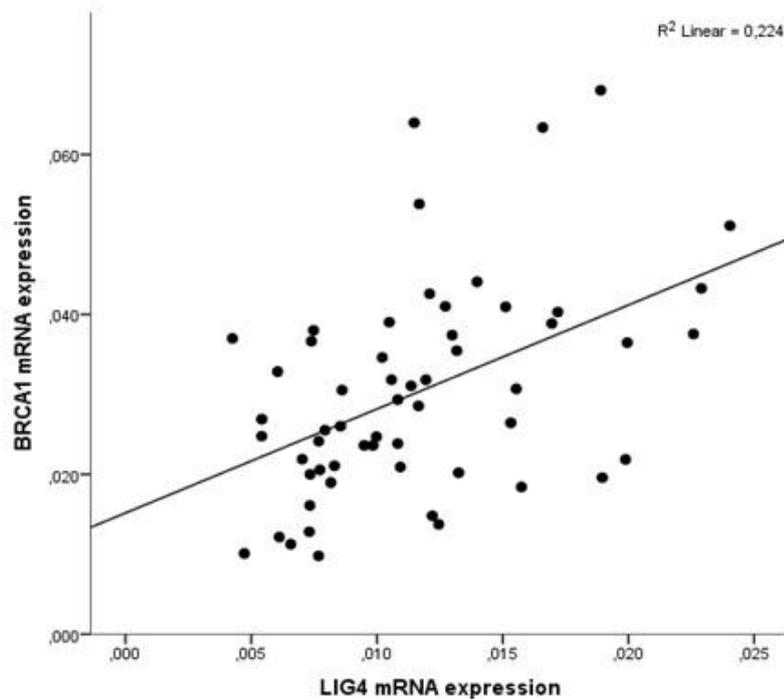
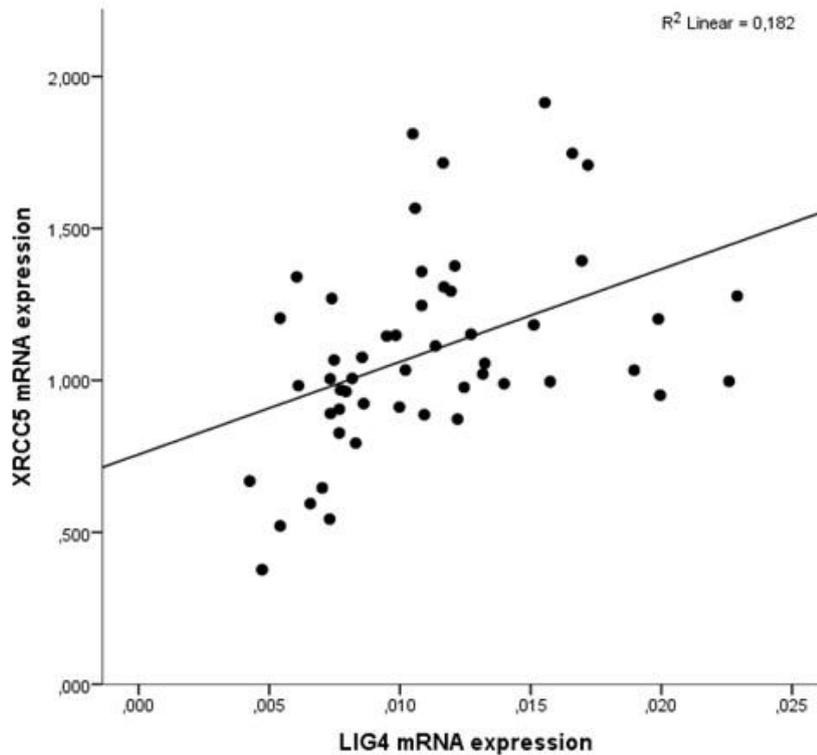


Figura 40: Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes XRCC5 e LIG4 de trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos.



Por fim, observou-se que há correlação fraca entre os genes *BRCA2* e *RAD51* ($r=0,268$; $p=0,03$) e *XRCC5* e *XRCC6* ($r=0,304$; $p=0,030$), demonstrando que esses genes são responsáveis respectivamente por 7,2% ($r^2=0,072$) e 9,3% ($r^2=0,093$) da variação dos seus respectivos níveis de expressão (Figura 41) (Figura 42).

Figura 41: Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes BRCA2 e RAD51 de trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos.

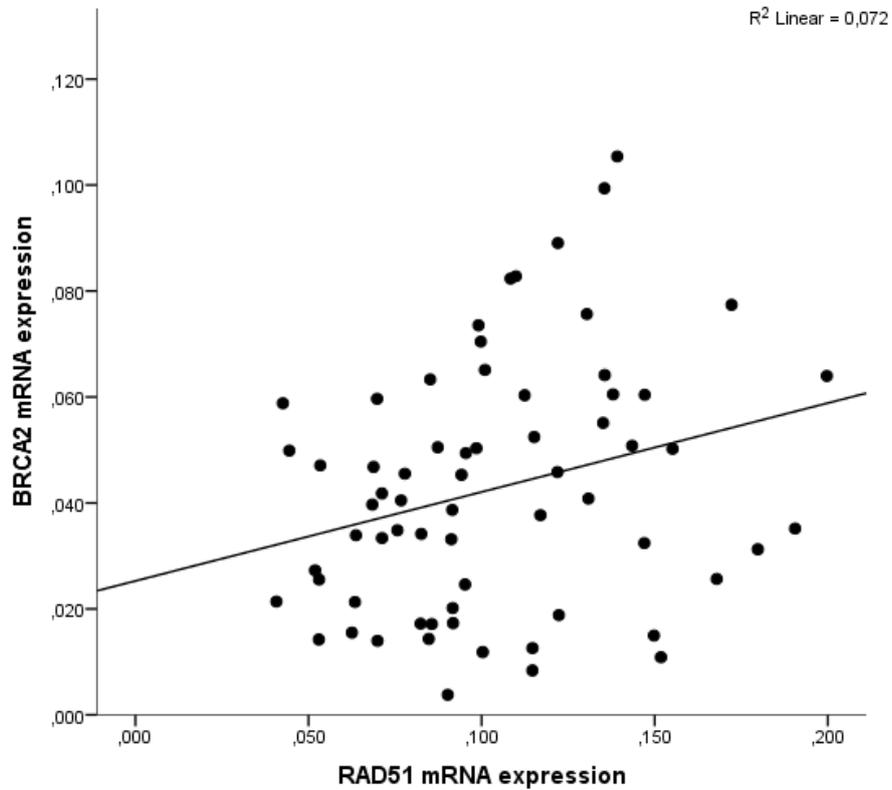
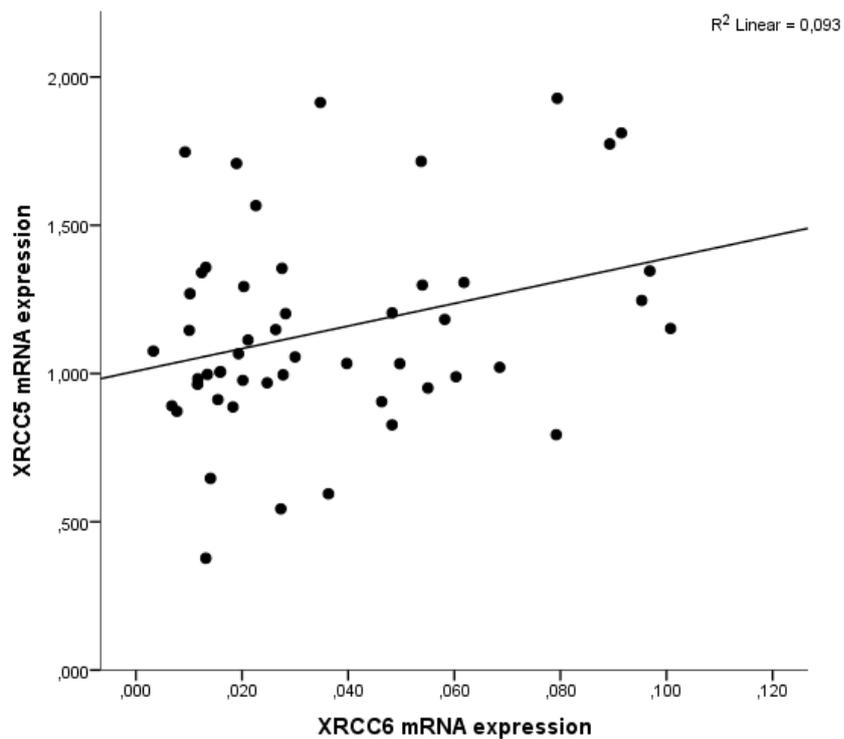


Figura 42: Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes XRCC5 e XRCC6 de trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos.



5. DISCUSSÃO

A população analisada no presente estudo foi de trabalhadores rurais do município de Limoeiro do Norte- CE, sendo caracterizados de acordo com o tipo de agricultura em que trabalham. Em nossas análises obtivemos que 55,55% (50/90) dos indivíduos eram grandes produtores, tal dado corrobora com o fato de que essa região é conhecida pelos inúmeros projetos de irrigação das grandes empresas nacionais e transnacionais voltados para a produção de frutas tropicais, o que projetou esse município como uma das “cidades do agronegócio” (SOARES, 2012).

O trabalho no campo é uma atividade que envolve tanto a participação de mulheres como de homens. Nesse estudo, no entanto, há o predomínio do sexo masculino com 97,77% (88/90), com uma média de idade de 44 anos, sendo 48,88% (44/90) dos trabalhadores com idade inferior ou igual à média. Tais dados aproximam-se bastante dos encontrados no Censo Agropecuário (2006) do IBGE, onde observou-se que a predominância do sexo masculino principalmente no agronegócio é de 79%, com a média etária em torno de 37 anos. Esses dados revelam uma predileção das empresas em contratar a força de trabalho jovem devido a exigência física necessária para o desempenho dos setores de produção, atuando como “estoque de braços fortes” (SOARES, 2012).

Quanto ao vínculo entre a terra e o tempo de trabalho com exposição a agrotóxicos, nesse estudo, obtivemos que 76,25% (61/80) dos trabalhadores apresentaram tempo de trabalho superior a doze anos, dado esse que se assemelha ao perfil dos trabalhadores em 2011 onde 52% já possuíam mais de doze anos de experiência na agricultura. Isto nos possibilita afirmar que, antes mesmo das empresas de agronegócio se reestruturarem (anos 1990), esses trabalhadores já manipulavam a terra (ARAUJO et al, 2007).

Em relação ao consumo de bebidas alcólicas, nesse estudo, foi referido que 54,44% (49/90) dos trabalhadores rurais bebem, sendo a cachaça com 66,6% (32/48) a bebida mais utilizada. O fato da predominância no consumo de bebidas alcoólicas pelos trabalhadores rurais, especialmente a cachaça, é justificado como uma condição para “suportar” o trabalho árduo, ou o “cheiro forte” dos agrotóxicos aos quais estão expostos (JONNALAGADDA, PRASAD, REDDY, 2010)

Quanto ao uso tabaco, em nosso estudo, encontramos que 75,55% dos trabalhadores não fazem uso do cigarro, dado este contrário aos dados do Censo 2006, onde os três segmentos de trabalhadores agrícolas relatam fumar diariamente (JONNALAGADDA, PRASAD, REDDY, 2010)

O uso de agrotóxicos nos cultivos foi relatado pelos trabalhadores em 88,8% (80/90) dos segmentos de estudados, correspondendo ao grande produtor e agricultura familiar, sendo que 45% (36/80) possuem contato direto com agrotóxico e o trabalho na área pulverizada a atividade mais relata com 36,25% (29/80) dos agricultores. Os trabalhadores informaram também utilizar uma ampla gama de produtos químicos, sendo o Roundup (12,5%) e o Gramoxone 200 (6,25%) os mais relatados.

É certo que os trabalhadores possuem ciência dos possíveis danos à saúde que podem ser causados pela exposição e manuseio de agrotóxicos, porém a luta pela sobrevivência da família resulta na necessidade de permanência no emprego e, conseqüentemente, no sacrifício de se expor aos agrotóxicos (PIGNATI, MACHADO, 2011). Os resultados apresentados também indicam que a distribuição do trabalho é melhor estratificada dentre os grandes produtores em relação aos agricultores familiares, pois nesse grupo todas as atividades são feitas pelo mesmo trabalhador (SOARES, 2012).

No que se refere aos produtos químicos que são utilizados, de acordo com o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos – PARA, conduzido pela Ministério da Saúde por meio da ANVISA, em 2009, o uso inadequado destes no cultivo reflete de forma importante na alimentação sendo o consumidor final o mais prejudicado e a indústria química a única que ganha no processo. Merece ser ressaltado o herbicida mais utilizado de nome comercial é Roundup, cujos os ingredientes ativos são o fosfometil e o glifosato, classificado de acordo a classe toxicológica e ambiental como mediantemente tóxico e pouco perigoso, embora seja descrito como causador de doenças como transtorno de déficit de atenção e hipertatividade, o Alzheimer, a Anencefalia, a Diabetes, o Linfoma Não-Hodgkin dentre outras. Enquanto que o herbicida que assumiu o segundo lugar o Gramoxone 200, cujo o ingrediente ativo é o paraquate e caracteriza-se como extremamente tóxico e muito perigoso, possui como sintomas de intoxicação aguda: sangramentos nasal, fraqueza, desmaio, conjuntivite e outros; e como sintomas de intoxicação crônica: lesões hepáticas, dermatites de contato, fibrose pulmonar dentre outras (EMBRAPA, 2012).

Em relação ao uso de EPIs, obtivemos 55% (44/80) dos trabalhadores utilizavam luvas para manusear agrotóxicos, 32,5% (26/80) utilizavam máscaras, 23,75% (19/80) usam óculos de proteção, 88,75% (71/80) usam chapéu, 81,25% (65/80) usam botas e 31,25% (25/80) usam macacão. Segundo Brasil (2005), mesmo os trabalhadores demonstrando conhecimento pela necessidade de proteção quando expostos a agrotóxicos, muitos dos agricultores não utilizam corretamente os EPIs por não lhes serem fornecido pelo empregador, no caso do grande produtor, ou por representar alta nos custos no caso da agricultura familiar.

Observamos ainda que, as formas de EPIs mais utilizadas pelos trabalhadores do agronegócio e da agricultura familiar são o chapéu, com o objetivo de proteger contra raios solares, as botas e as luvas, que são mais utilizados para proteção contra animais peçonhentos e materiais perfuro-cortantes, porém esses equipamentos não os mais necessários para proteção contra exposição de tóxicos (AUGUSTO, 2012).

Quanto a lavagem em casa das roupas utilizadas no trabalho, 78,76% (63/80) dos trabalhadores confirmaram ser em casa e 11,25% (9/80) não, tal hábito amplia o risco de contaminação para o ambiente domiciliar tornando-o susceptível aos efeitos dos agrotóxicos. Estudos como o de Araújo, Nogueira e Augusto (2000) identificaram, dentre os trabalhadores de Pernambuco, a domiciliarização do risco, aonde a limpeza das roupas em casa dissemina a contaminação para toda a família.

No que se refere ao destino das embalagens vazias de agrotóxico, as opções mais utilizadas foram 15% (12/80) queimam, enquanto que 13,75% armazenam as embalagens. Os estudos demonstram que as práticas de descarte de embalagens variam de acordo com o tipo de agricultura empregada, por exemplo, em se tratando do agronegócio foi demonstrado que o armazenamento se destaca dentre os 37,2% dos trabalhadores, já para a agricultura familiar 49,2% afirmam que com frequência queimam as embalagens (PIGNATI, MACHADO, 2011).

Em relação aos resultados citogenéticos obtivemos que para o grupo de grandes produtores 16,6% (15/90) de cariótipo normal e 8,88% (8/90) cariótipo alterado, para a agricultura familiar 6,6% (6/90) possuem cariótipo normal e 3,33% cariótipo alterado, e por fim, para a agricultura ecológica 7,7% (7/90) com cariótipo normal e 1,1% (1/90) com cariótipo alterado. A diferença significativa entre os índices de alterações cromossômicas serem maiores em trabalhadores do agronegócio quando comparado com os trabalhadores da agricultura ecológica pode estar relacionado com as consequências a longo prazo oriunda da exposição a tóxicos, pois mesmo que os agrotóxicos utilizados não apresentem um risco elevado, de acordo com teste toxicológicos feitos em animais, ainda assim há diversas modificações metabólicas ao organismo (HALLMANN, 2014).

Nesta pesquisa realizamos o primeiro estudo de análise da expressão dos genes de reparo em lesão de fita dupla (DSBs) do DNA em medula óssea de agricultores expostos a agrotóxicos. Os genes relacionados às DSBs (*ATM*, *BRCA1*, *BRCA2*, *RAD51*, *XRCC5*, *XRCC6* e *LIG4*) foram associados com as diversas variáveis de caracterização demográfica, hábitos de vida, caracterização do trabalho, caracterização da exposição do trabalhador e medidas de controle de riscos de trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos.

Inicialmente, observamos importantes achados relacionados aos níveis de expressão dos genes *ATM*, *LIG4* e *XRCC5* com a variável tempo de exposição ao agrotóxico, conforme demonstrado nas figuras 14,16, 23 e 29, e com a variável grupo de trabalhadores rurais, demonstrado nas figuras 15, 22, 30.

Os genes *ATM* e *LIG4* apresentaram um perfil de expressão significativamente reduzido em relação ao tempo quando este for superior ou igual a 12 anos de exposição. Já o gene *XRCC5* apresentou expressão significativamente aumentada em relação ao tempo de exposição a agrotóxicos na agricultura familiar por 12 anos ou mais. Em relação aos grupos de trabalhadores rurais, observamos no grupo de grandes produtores a expressão reduzida em todos genes citados quando comparado com os demais grupos de trabalhadores.

Os possíveis efeitos causados pela genotoxicidade dos agrotóxicos ainda não são bem esclarecidos, porém sabe-se que o tempo de exposição ao agrotóxico e, principalmente, o tipo de agricultura exercida caracterizam a cronicidade da exposição. Onde a resposta ao maior estresse genotóxico são as lesões no DNA, que podem atuar bloqueando diversas funções, entre elas o bloqueio do ciclo celular e do mecanismo de reparo do DNA influenciando assim na supressão da expressão dos genes envolvidos (SOARES, 2012).

Nesse estudo identificamos também que os genes *LIG4*, *XRCC5* e *XRCC6* são significativamente associados a variável álcool, como demonstrado nas figuras 20 ,24 ,28, e apenas o gene *LIG4* possui nível de expressão significante para a variável fumo, demonstrado na figura 27. Onde os genes *LIG4*, *XRCC5* e *XRCC6* apresentaram expressão aumentada para os trabalhadores que consomem álcool e somente o gene *LIG4* apresentou expressão significativamente aumentada para o fumo.

Sabe-se que o consumo do cigarro e do álcool são importantes fatores externos que atuam como causadores de danos na dupla fita de DNA e, conseqüentemente, são ditos como agentes carcinogênicos. Segundo Soares e Porto (2007), aproximadamente, 3% de todos os cânceres dos Estado Unidos eram atribuídas as vítimas de alcoolismo. Entretanto, os resultados de muitos estudos afirmam que o álcool não atua como um carcinógeno direto, mas sim como um co-carcinógeno ou agente promotor de câncer, sendo seus efeitos potencializados quando combinados com o uso do fumo, por exemplo (PIGNATI, MACHADO, 2011).

Pode-se dizer ainda que os mecanismos relacionados à atuação do álcool e do fumo no desenvolvimento do câncer são muitos, pois, além de atuarem na permeabilidade dos fatores carcinogênicos, são conhecidos como promotores do estresse oxidativo celular. Dessa forma, com o objetivo de manter a integridade celular e a estabilidade do genoma, os genes de reparo

aumentam sua expressão afim de corrigir e minimizar os efeitos por eles causados (JONNALAGADDA, PRASAD, REDDY, 2010)

Em relação ao uso de EPIs, nosso estudo apresentou significância para o gene *XRCC6* em relação a variável uso de máscara, demonstrado na figura 26, e para o gene *XRCC5* em relação a variável uso de macacão, demonstrado na figura 21.

Em relação aos genes *XRCC5* e *XRCC6* o perfil de expressão foi significativamente reduzido para o uso frequente de macacão e o uso frequente de máscara, respectivamente. Para Seralini et al. (2014), dos 7 milhões de agricultores americanos, 323 mil são agredidos por graves doenças decorrentes dos agrotóxicos. Isso ocorre devido as ameaças os quais estão expostos ao longo prazo, o que leva a bioacumulação das substâncias tóxicas no organismo.

De acordo com Vinggard (2005), os registros de casos de intoxicações humanas vêm aumentando com o passar do tempo pois na maioria das vezes, o trabalhador ignora as práticas apropriadas para o manejo e uso dos agrotóxicos, tornando-se o principal alvo dos seus efeitos adversos. Segundo Peres et al. (2005), as principais vias por onde ocorre a absorção usual dos agrotóxicos são: oral, respiratória e dérmica, ressaltando assim a importância da expressão significativamente baixa dos genes pertencentes aos mecanismos de reparo do DNA quando em uso correto dos EPIs.

Nesse estudo obtivemos ainda significância em relação ao gene *BRCA1* e a variável sexo masculino, demonstrado na figura 17, o gene *XRCC6* e a variável tipo de contato com agrotóxico, demonstrado na figura 25, e o gene *BRCA2* e a variável local de lavagem de roupas do trabalho, demonstrado na figura 19.

Os trabalhadores agrícolas constituem um dos grupos ocupacionais mais expostos aos agrotóxicos, principalmente os que são relacionados ao agronegócio, onde é quase que unânime a predominância do sexo masculino em virtude do trabalho ser árduo, o que justifica o fato de apresentarem os níveis aumentados dos mecanismos de reparo tentando corrigir os danos de exposição sexo masculino (PERES et al, 2005).

É a pele o órgão que apresenta contato mais direto com os agentes químicos durante a atividade de sua dispersão no ambiente. Assim, o tumor de Bowen (carcinoma in situ), carcinoma basocelular múltiplo e carcinoma de células escamosas, constituem os maiores riscos para estes trabalhadores (PERES et al, 2005). Dessa forma, é possível constatar que o contato direto com os cultivos que fazem uso de agrotóxico resultam na redução da expressão desses genes de reparo por possivelmente lesarem este mecanismo.

Por fim, obtivemos um perfil de expressão significativo para o gene *BRCA2* e a variável cariótipo, demonstrado na figura 18. A expressão do gene *BRCA2* apresentou-se reduzida para o cariótipo alterado em relação ao cariótipo normal.

A probabilidade de ocorrência de alterações gênicas e a sua persistência nos clones subsequentes podem ser influenciadas pela capacidade dos organismos de metabolizar e excretar substâncias potencialmente tóxicas e também pela sua eficiência no reparo dos erros ocorridos no DNA durante a sua replicação. Dentre os tipos de alterações podemos mencionar as dominantes de alta e baixa penetrância. As de alta penetrância conferem um risco individual alto aos seus portadores, mas como, geralmente, são mutações raras respondem por uma pequena porcentagem de todos os casos de câncer. As mutações de baixa penetrância, entretanto, são genéticas comuns, como aquelas que regulam o metabolismo e a desintoxicação de carcinógenos, acarretam um risco individual baixo, mas no nível populacional podem ter um impacto grande devido à sua alta frequência na maioria das populações (SÉRALINI et al., 2014). Dessa forma, a redução da expressão gênica obtida por meio do mecanismo de reparo danificado resulta em diversas alterações citogenéticas em indivíduos expostos a agrotóxicos.

Neste contexto, diversos autores demonstram que com o objetivo de manter a integridade genômica, a manutenção do metabolismo celular e reduzir os efeitos do número de mutações herdáveis os mecanismos de reparação do DNA de dupla fita atuam corrigindo danos e neutralizando os efeitos letais. Dessa forma, as células ativam uma complexa rede de vias que conduzem para a reparação de danos e a retomada do ciclo celular normal. Este fato pode ser corroborado quando se observa que esses genes se correlacionam positivamente, como é o caso da correlação forte identificada entre os genes *BRCA1* e *RAD51* (Figura 33) e *BRCA1* e *XRCC5* (Figura 34), da correlação moderada que há entre os genes *ATM* e *XRCC5* (Figura 35), *ATM* e *LIG4* (Figura 36), *BRCA1* e *BRCA2* (Figura 32), *BRCA1* e *XRCC6* (Figura 38), *BRCA1* e *LIG4* (Figura 34) e *XRCC5* e *LIG4* (Figura 40), e a correlação fraca mas significativa que há entre os genes *BRCA2* e *RAD51* (Figura 41) e *XRCC5* e *XRCC6* (Figura 42). Além disto, Difilippantonio e colaboradores (2000) citam que deficiências na via de reparo HR e NHEJ podem levar ao aumento da instabilidade genômica e consequente processo de tumorigênese (DIFILIPPANTONIO et al., 2000).

Assim, a predominância da redução do nível de expressão destes genes demonstra que possivelmente o maquinário celular de reconhecimento e reparo de fita dupla do DNA encontra-se lesado e por isso inativo, o que faz com que a medula óssea desses trabalhadores rurais expostos a agrotóxico esteja susceptível aos processos de neoplásicos.

6. CONCLUSÃO

A partir do desenvolvimento deste estudo, podemos concluir que:

- Inferimos que os genes *ATM*, *BRCA1*, *BRCA2*, *XRCC5*, *XRCC6* e *LIG4* podem corresponder a novos marcadores moleculares para a compreensão dos mecanismos celulares de ação que são influenciados e/ou danificados em organismos expostos por tempos prolongados a agrotóxicos;

- Demonstramos que os comportamentos dos genes *ATM*, *LIG4*, *BRCA1*, *XRCC5* e *XRCC6* apresentaram níveis de expressão significativamente reduzidos para as diversas variáveis de caracterização da exposição a tóxicos possivelmente devido ao bloqueio do mecanismo de reparo ao qual são genes atuantes;

- Demonstramos também a expressão reduzida do gene *BRCA2* em relação a variável cariótipo com alterações, onde possivelmente danos a esse gene estejam associados a anormalidades cromossômicas na medula óssea de trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos;

- Estes resultados suportam a importância dos genes *ATM*, *BRCA1*, *BRCA2*, *XRCC5*, *XRCC6* e *LIG4* na manutenção da estabilidade genômica promovendo um melhor entendimento dos mecanismos celulares influenciados pela exposição a agrotóxicos.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHNESORG, P.; SMITH, P.; JACKSON, S. P. XLF interacts with the XRCC4-DNA ligase IV complex to promote DNA nonhomologous end-joining. *Cell*, v. 124, n. 2, p. 301-313, 2006.

ALEXANDER, A.; WALKER, C.L. Differential localization of ATM is correlated with activation of distinct downstream signaling pathways. *Cell Cycle*, v. 9, p. 3685–3686, 2010.

ALEXANDRE, SF. Exposição a agrotóxicos e fertilizantes: agravos à saúde dos trabalhadores no agronegócio do abacaxi em Limoeiro Norte-CE. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

ALMEIDA, FV et al. Substâncias tóxicas persistentes (STP) no Brasil. *Química Nova*, vol. 30, n. 8, p. 1.976-85, 2007.

AQUINO, S. L. et al. 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 em 2006. Disponível em: http://www.nead.gov.br/tmp/encontro/cdrom/gt/2/Silvia_Lima_de_Aquino.pdf. Acesso em: 2 jul. 2007.

ARAÚJO, A. J.; LIMA, J. S.; MOREIRA, J. C.; JACOB, S. C. et al. Exposição múltipla a agrotóxicos e efeitos à saúde: estudo transversal em amostra de 102 trabalhadores rurais, *Ciênc Saúde Colet*, Rio de Janeiro, Nova Friburgo, v. 12, n. 1, p. 115-130, 2007.

ARAÚJO, A. C. P.; NOGUEIRA, D. P.; AUGUSTO, L. G. S. Impactos dos praguicidas na saúde: estudo da cultura de tomate. *Rev. Saúde Pública*, São Paulo, v. 34, n. 3, p. 309- 313, jun. 2000.

AUGUSTO, LGS. Transgênicos. In: CALDART, RS et al. (orgs.). *Dicionário da educação do campo*. Rio de Janeiro: Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio; São Paulo: Expressão Popular, 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*. 2. Ed. Recife: Ed. Universitária da UFPE, 2005. P.57-59.

BAO, S.; TIBBETTS, R. S.; BRUMBAUGH, K. M.; FANG, Y.; RICHARDSON, D. A.; ALI, A.; CHEN, S. M.; ABRAHAM, R. T.; WANG, X. F. ATR/ATM-mediated phosphorylation of human Rad17 is required for genotoxic stress responses. *Nature*, v. 411, n. 6840, p. 969-974, 2001.

BELLI, M.; SAPORA, O.; TABOCCHINI, M. A. Molecular targets in cellular response to ionizing radiation and implications in space radiation protection. *J. Radiat. Res (Tokyo)*, v. 43, Suppl., p. S13-19, 2002.

BENSIMON, A.; AEBERSOLD, R.; SHILOH, Y. Beyond ATM: the protein kinase landscape of the DNA damage response. *FEBS Lett.*, v. 585, n. 11, p.1625-39, 2011.

BURMA, S. Role of non-homologous end joining (NHEJ) in maintaining genomic integrity. *DNA Repair (Amst.)*, v. 5, n. 9-10, p. 1042-1048, 2006.

BUSTIN, S.A.; BENES, V.; GARSON, J.A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem.*, v. 55, n. 4, p. 611-22, 2009.

CAIRES, S. M., CASTRO, J. G. D. Levantamento dos agrotóxicos usados por produtores rurais do município de Alta Floresta – Mato Grosso. *Revista de Biologia e Ciências da terra, João Pessoa*, v.2, n. 1. 2002. Disponível em: < http://www.uepb.edu.br/eduep/rbct/sumarios/sumario_v2_n1.htm> Acesso em: 20 set. 2006

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

CLARKE, G.M; ANDERSON, C.A; PETERSSON, F.H.; et al. Basic statistical analysis in genetic case-control studies. *Nature protocols*, v. 6, n. 2, p. 121 - 133, 2011.

DIFILIPPANTONIO, M. J.; ZHU, J.; CHEN, H. T.; MEFFRE, E.; NUSSENZWEIG, M. C.; MAX, E. E. et al. DNA repair protein Ku80 suppresses chromosomal aberrations and malignant transformation. **Nature**, v. 404, p. 510-514, 2000.

ECONOMOPOULOU, P.; PAPPAS, V.; KONTSIOTI, F.; PAPAGEORGIOU, S.; FOUKAS, P.; LIAKATA, E.; ECONOMOPOULOU, C.; VASSILATOU, D.; IOANNIDOU, E. D.; CHONDROPOULOS, S.; TSIRIGOTIS, P.; PAPAGEORGIOU, E.; DERVENOULAS, J.; ECONOMOPOULOS, T. Expression analysis of proteins involved in the non homologous end joining DNA repair mechanism, in the bone marrow of adult de novo myelodysplastic syndromes. *Ann. Hematol.*, v. 89, n. 3, p. 233-239, 2010.

FARIA, N. M. X., FASSA, A. G., FACCHINI, L. G. Pesticides poisoning in Brazil: the official notification system and challenges to conducting epidemiological studies. *Ciência e saúde coletiva*, Rio de Janeiro, v.12, n.1, p. 25-38, mês. 2007.

FERREIRA, H. S. Pesticidas no Brasil: impacto ambiental e possíveis conseqüências de sua interação com a desnutrição humana. *Revista Brasileira de Saúde Ocupacional*, São Paulo, v. 80, n. 21, p. 51-60. 1999.

FIGUEIRA, D.G. História. 1 Ed. São Paulo: Ática, 2007.

HALLMANN, CA et al. Declines in insectivorous birds are associated with high neonicotinoid concentrations. *Nature*, 511, p.341-3, 2014.

HOEIJMAKERS, J. H. DNA damage, aging, and cancer. *N Engl J Med*, v. 361, n. 15, p. 1475-85, 2009.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo Agropecuário 2011. [Acesso em 11 dez. 2017] Disponível em:

http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/2006/tabela1_3_10.pdf>.

IYAMA, T.; WILSON, D. M. DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. *DNA Repair (Amst)*, v. 12, n. 8, p. 620-36, 2013.

JONNALAGADDA, P. R.; PRASAD, A. Y. E.; REDDY, K. A. et al. Biochemical alterations of certain health parameters in cotton growing farmers exposed to organophosphorous and pyrethroid insecticides. *African Journal of Biotechnology*, v. 9, n. 49, p. 8369-8377, 6 December, 2010.

KAO, J.; ROSENSTEIN, B. S.; PETERS, S.; MILANO, M. T.; KRON, S. J. Cellular response to DNA damage. *Ann. N Y Acad. Sci.*, v. 1066, p. 243-258, 2005.

KENYON, J.; GERSON, S. L. The role of DNA damage repair in aging of adult stem cells *Nucl. Acids Res.*, v. 35, n. 22, p. 7557-7565, 2007.

KIM, P. M.; ALLEN, C.; WAGENER, B. M.; SHEN, Z.; NICKOLOFF, J. A. Overexpression of human RAD51 and rad52 reduces double-strand break-induced homologous recombination in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.*, v. 29, n. 21, p.4352-4360, 2001.

KOIFMAN, S., KOIFMAN, R. J., MEYER, A. Human reproductive system disturbances and pesticide exposure in Brazil. *Cadernos de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v.18, n. 2, p. 43545, mar./apr. 2002.

LAPENNA, S. AND A. GIORDANO, Cell Cycle kinases as therapeutic targets for cancer. *Nat Rev Drug Discov*, 2009. 8(7): p. 547-66.

LEMPIAINEN, H.; HALAZONETIS, T.D. Emerging common themes in regulation of PIKKs and PI3Ks. *EMBO J.*, v. 28, pp. 3067–3073, 2009.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the 2(-Delta DeltaC(T)) method. *Methods.*, v. 25, p. 402-408, 2001.

MEYER, A. et al. Cancer mortality among agricultural workers from Serrana Region, state of Rio de Janeiro, Brazil *Environmental Research*, Basel, v. 93, n. 3, p. 264-71, nov. 2003.

OZTURK, S.; DEMIR, N. DNA repair mechanisms in mammalian germ cells. *Histol Histopathol*, v. 26, n. 4, p. 505-17, 2011.

PANDITA, T. K. Role of ATM in pathways of DNA double-strand-break repair. *Exp. Rev. Mol. Med.*, v. 20, p. 5, 2003.

PASTWA, E.; BLASIAK, J. Non-homologous DNA end joining. *Acta Biochim. Pol.*, v. 50, n. 4, p. 891-908, 2003.

PEDWLOWSKI, M.A; et al. Um estudo sobre a utilização de agrotóxicos e os riscos de comunicação nem assentamento de Reforma Agraria no Norte Fluminense. **J. Braz. Soc. Ecotoxicol**, v.1, 2007.

PERES, F.; SILVA, J.J.O.; DELLA-ROSA, H.V.; LUCCA, S.R. Desafios ao estudo de contaminação humana e ambiental por agrotóxicos. *Ciênc. Saúde Coletiva*, v. 10 suppl. 0 Rio de Janeiro Sept./Dec. 2005.

PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.*, v. 29, n. 9, p.e45, 2001.

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.*, v. 26, n. 6, p. 509-15, 2004.

PIGNATI, W. A. ; MACHADO, J. M. H. O Agronegócio e seus impactos na Saúde dos Trabalhadores e da População do Estado de Mato Grosso. In: _____. *Saúde do trabalhador na sociedade brasileira contemporânea*. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2011. Cap. 11, p. 245-272.

PIGNATI, W. A., MACHADO, J. M. H., CABRAL, J. F. Major rural accident: the pesticide “rain” case in Lucas do Rio Verde city – MT *Ciência e saúde coletiva*, Rio de Janeiro, v. 12, n.1, p. 105-114, mês. 2007.

PINHEIRO, R. F.; CHAUFFAILLE, M. L. Comparison of I-FISH and G-banding for the detection of chromosomal abnormalities during the evolution of myelodysplastic syndrome. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 42, n. 11, p. 1110-1112, 2009.

POTTI, A. et al. Effect of pesticide exposure on HER-2/neu overexpression seen in patients with extensive stage small cell lung carcinoma. *Clinical Cancer Research*, Philadelphia, v. 9, n.13, p. 4872-4876, out. 2003.

RIBEIRO Jr, H. L.; DE OLIVEIRA, R. T.; MAIA, A. R.; DE SOUSA, J. C.; HEREDIA, F. F.; MAGALHÃES, S. M.; PINHEIRO, R. F. ATM polymorphism is associated with low risk myelodysplastic syndrome (2012). *DNA Repair (Amst.)*, Dec 2012.

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.*, v. 33, n. 4, p. 220-228, 2015.

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. *Genética do Câncer humano*. In: _____ *Mutagênese ambiental*. Canoas: Ed. ULBRA, 2003. Cap. 2, p. 29-48.

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

RODVALL, Y., DICH, J., WIKLUND, K. Cancer risk in offspring of male pesticide applicators in agriculture in Sweden. *Occupational Environment Medicine*, Helsinki, v. 60, n. 10, p. 798-801, out. 2003.

SCHMITTGEN, T.D.; LIVAK, K.J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc.*, v. 3, n. 6, p. 1101-8, 2008.

SÉRALINI, G-E et al. Conclusiveness of toxicity data and double standards. *Food and Chemical Toxicology*, n. 69, p. 357-9,

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, *Cien. Saúde Coletiva*, Rio de Janeiro, v. 10, n. 4, p. 891-903, 2004.

SOARES, WL; PORTO, MF. Atividade agrícola e externalidade ambiental: uma análise a partir do uso de agrotóxicos no cerrado brasileiro. *Ciência & Saúde Coletiva [on-line]*, vol. 12, n.1, p. 131-43, 2007.

SOARES, WL; PORTO, MFS. Uso de agrotóxicos e impactos econômicos sobre a saúde. *Revista de Saúde Pública*, vol. 46, n. 2. p. 209-17, 2012.

SONODA, E. Differential usage of non-homologous end-joining and homologous recombination in double strand break repair. *DNA Repair (Amst.)*, v. 5, n. 9/10, p. 1021-1029, 2006.

VALERIE, K.; POVIRK, L. F. Regulation and mechanisms of mammalian double-strand break repair. *Oncogene*, v. 22, n. 37, p. 5792-5812, 2003.

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.*, v. 3, n. 7, p. RESEARCH0034, 2002.

VAN GENT, D. C.; HOEIJMAKERS, J. H.; KANNAR, R. Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nat. Rev. Genet.*, v. 2, n. 3, p. 196-206, 2001.

VINGGAARD, AM et al. Perinatal exposure to the fungicide prochloraz feminizes the male rat offspring. *Toxicological Sciences*, vol. 85, n. 2, p. 886-97, 2005.

WETERINGS, E.; VAN GENT, D. C. The mechanism of non-homologous end joining: a synopsis of synapsis. *DNA Repair (Amst.)*, v. 3, n. 11, p. 1425-1435, 2004.

YOSHIDA, K.; MIKI, Y. Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage. *Cancer Sci.*, v. 95, n. 11, p. 866-871, 2004.

APÊNDICE A



Universidade Federal do Ceará/UFC

Introdução: Estamos desenvolvendo uma pesquisa intitulada “**Alterações moleculares em genes supressores tumorais de células da medula óssea 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 encontram-se 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 Luiz Ivando Pires Filho: 85 -3366 8623

Assinatura do sujeito envolvido

APÊNDICE B
Questionário de Exposição aos Agrotóxicos

Você trabalha no cultivo da banana?

1. () Sim 2. () Não.

Se sim há quanto tempo _____ (anos/

meses)

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

NOME: _____

DATA DE NASCIMENTO: _____ TELEFONE: _____

ENDEREÇO _____

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

PARTE 1 – CARACTERÍSTICA DEMOGRÁFICA

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

PARTE 2 - HÁBITOS DE VIDA

202	Você faz uso de algum tipo de bebida alcoólica?	<p style="text-align: center;">Não bebo</p> Raramente bebo Mensalmente Semanalmente Diariamente Não sei Não respondeu	<p style="text-align: center;">1</p> 2 3 4 5 88 99	→204
203	Qual o seu tipo de bebida preferida?	<p style="text-align: center;">Cachaça</p> Cerveja Vinho Conhaque Rum Vodka Outro (_____) <p style="text-align: center;">Não respondeu</p>	<p style="text-align: center;">1</p> 2 3 4 5 6 7 99	
204	Você tem o hábito de fumar?	<p style="text-align: center;">Não fumo</p> Raramente fumo Diariamente Não respondeu	<p style="text-align: center;">1</p> 2 3 99	→207
		<p style="text-align: center;">De 1 a 4 vezes ao dia</p> De 5 a 9 vezes ao dia	<p style="text-align: center;">1</p> 2	T anos _____

205	Qual a frequência do uso de fumo por você?	10 a 19 vezes ao dia Mais de 20 vezes ao dia Não respondeu	3 4 99	
-----	--	--	--------------	--

PARTE 3 - HISTÓRIA PREGRESSA FAMILIAR

312	Alguma pessoa da sua família teve algum tipo de câncer nos últimos dez anos?	(_____)	Sim Não Quem Não sei Não respondeu	1 2 3 88 99	→401
313	Que tipo de câncer essa pessoa da sua família apresentou?	(_____)	Pele Mama Útero Ovário Sangue/Leucemia Outros 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 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 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	1 2 3 4 5 6 7 8	

		Aplicador de Agrotóxicos	9	
		Preparador de mudas	10	
		Plantador	11	
		Irigadores	12	
		Adubação	13	
		Desbaste	14	
		Eliminação de pencas ou falsa penca	15	
		Eliminação do coração	16	
		Limpeza do cacho	17	
		Escoramento das bananeiras	18	
		Desvio do cacho ou do “filho”	19	
		Rebaixamento do pseudocaule (tronco)	20	
		Embolsamento de cachos	21	
		Marcador de cacho	22	
		Rebaixador inicial	23	
		Rebaixador final	24	
		Desfolha	25	
		Colhedor de frutas	26	
		Pós-colheita	27	
		Tratorista	28	
		Cozinheiro	29	
		Outros	30	
		(_____)	99	
		Não respondeu		

PARTE 5 - CARACTERIZAÇÃO DA EXPOSIÇÃO DO TRABALHADOR

503	Se na empresa que você trabalha existe uso de agrotóxicos (veneno), você tem algum contato com eles?	Sim 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	1 2 3 4 88 99	

		Não respondeu	
--	--	---------------	--

508	Quais são os agrotóxicos (veneno) que você tem contato? OBS: os que estão grifados são herbicidas	<p>Bayfidan EC 1</p> <p>Bórax 2</p> <p>Bravonil 500 3</p> <p><u>Carbofuran</u> 4</p> <p>Cercobin 500SC 5</p> <p>Cobre Atar BR 6</p> <p>Comet 7</p> <p>Cuprozeb 8</p> <p>Domark 100EC 9</p> <p><u>Finale</u> 10</p> <p>Flare 11</p> <p>Folicur 200 CE 12</p> <p>Fugiscan 700WP 13</p> <p>Garant 14</p> <p><u>Gramocil</u> 15</p> <p><u>Gramoxone 200</u> 16</p> <p>Ícarus 17</p> <p>Impact 125SC 18</p> <p>Juno 250CE 19</p> <p>Manzate 800 20</p> <p>Metiltiofan 21</p> <p>Mythos 22</p> <p>Nativo 23</p> <p>Opera 24</p> <p>Opus SC 25</p> <p>Orius 250EC 26</p> <p><u>Roundup</u> 27</p> <p>Score 28</p> <p><u>Scout NA</u> 29</p> <p>Soprano 125SC 30</p> <p>Soprano 25 EC 31</p> <p>Stratego 250 EC 32</p> <p>Sulfato de cobre 33</p> <p>Support 34</p> <p>Tango Cash 35</p> <p>Tecto SC 36</p> <p>Tilt 37</p> <p>Triade 38</p> <p>Triazol 39</p> <p>Virtue 40</p> <p>Outros 41</p> <p>(_____) 88</p> <p>) 99</p> <p>Não sei</p> <p>Não respondeu</p>	
509	Há quanto tempo você trabalha com agricultura familiar?	<p>Meses _____</p> <p>Anos _____</p> <p>Não sei _____</p> <p>Não respondeu _____</p> <p>88</p> <p>99</p>	
510	Qual é a frequência com que você entra em contato com agrotóxicos (veneno)?	<p>Diária – horas / dia _____/ _____</p> <p>Semanal - dia / semana _____/ _____</p> <p>Mensal – semana / mês _____/ _____</p> <p>Anual – meses/ano _____/ _____</p>	

		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 <u>2,4 – D</u> <u>Propanil</u> 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	1	2	3	88	99	
Banho após o trabalho	1	2	3	88	99		
Nenhuma proteção		2					
614	Onde são lavados os EPIs que você usa no trabalho?			Em casa Na empresa Não respondeu	1 2 99	→61 5	
615	Onde são lavadas as roupas que você usa no trabalho?			Em casa Na empresa Não respondeu	1 2 99	→61 6 →61 7	
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 Enterra Reutiliza Armazena	1 2 3 4		

