



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

BIOMONITORAMENTO GENÉTICO DE INDIVÍDUOS EXPOSTOS
OCUPACIONALMENTE A PESTICIDAS NO POVOADO VILA BESSA, MUNICÍPIO
DE CONCEIÇÃO DO JACUIPE, BAHIA.

MARIA EMILIA SANTOS PEREIRA RAMOS

Fortaleza
2009

R144b Ramos, Maria Emilia Santos Pereira
Biomonitoramento genético de indivíduos expostos
ocupacionalmente a pesticidas no povoado Vila Bessa,
município de Conceição do Jacuípe, Bahia/ Maria Emilia
Santos Pereira Ramos. – Fortaleza, 2009.
139 f. : il.

Orientador: Profa. Dra. Cláudia de Ó Pessoa
Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará.
Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação
em Farmacologia. Fortaleza, Ce.

1. Exposição Ocupacional 2. Praguicidas 3.
Aberrações Cromossômicas I. Pessoa, Cláudia de Ó
(orient.) II. Título.

CDD: 363.1792

MARIA EMILIA SANTOS PEREIRA RAMOS

**BIOMONITORAMENTO GENÉTICO DE INDIVÍDUOS EXPOSTOS
OCUPACIONALMENTE A PESTICIDAS NO POVOADO VILA BESSA, MUNICÍPIO
DE CONCEIÇÃO DO JACUIPE, BAHIA.**

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Claudia do Ó Pessoa

Fortaleza

2009

Maria Emilia Santos Pereira Ramos

Biomonitoramento genético de indivíduos expostos ocupacionalmente a pesticidas no povoado Vila Bessa, município de Conceição do Jacuípe, Bahia.

Esta Tese foi submetida como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Farmacologia, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca de Ciências da Saúde da referida Universidade.

Tese aprovada em 27/11/2009

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Claudia do Ó Pessoa
Orientadora da Tese

Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho
Universidade Federal do Ceará

Profa. Dra. Maria Goretti Rodrigues de Queiroz
Universidade Federal do Ceará

Profa. Dra. Silvia Regina de Almeida Reis
Universidade Federal da Bahia

Prof. Rommel Mario Rodriguez Burbano
Universidade Federal do Pará

Não te mandei eu? Esforça-te, e tem bom ânimo;
não temas, nem te desanime; porque o SENHOR
teu Deus é contigo, por onde quer que andares.

Josué 1.9

AGRADECIMENTOS

Ao meu e todo poderoso Deus, em nome do seu filho amado Jesus Cristo, agradeço por ter me concedido a oportunidade de abraçar e concluir mais essa etapa na minha vida.

Ao meu marido Tercio e aos meus filhos João Victor e André que viveram comigo esse doutorado, compartilhando todos os momentos que envolveram as aulas, os trabalhos e as atividades de pesquisas, meu muito obrigada.

A minha família, em especial minha mãe, por ter assumido junto comigo esse doutorado, e minha irmã Patrícia pela colaboração.

A minha amiga e orientadora profa. Claudia, por todos os momentos que passamos juntas, pelas orientações e pelo verdadeiro acolhimento. Que Deus te abençoe ricamente.

Ao amigo Bruno por toda ajuda dispensada, e minha amiga e fiel companheira de morada Marne, a qual Deus escolheu para convivermos no Ceará..

Aos meus colegas de doutorado André, Heitor e em especial a Roberta Dalcico, a quem Deus me presenteou com sua amizade.

A Sra. Edinair Santana pela atenção e colaboração durante toda a execução da pesquisa.

Aos meus alunos de Iniciação Científica: Tiago, Priscila, Aline, Anna Luiza, Rosane, Camila, Danilo Alves, Danilo Avelar, Fernando, Jéferson e colaboradoras Cleide e Paula, meu muito obrigada pela amizade e dedicação.

Aos meus amigos de disciplina Ciça, Tercio, Valéria, Fernando, Marcio, Michele, meu muito obrigada pelo apoio.

A Lavínia pela imensa colaboração durante a pesquisa, e Leonardo.

As funcionários da UNIFAC: Malu, Teresa, Fábria, Flávia e prof. Vagnaldo pela atenção.

A profa. Elisabete e o prof. Odorico pelo cuidado sempre dispensado desde 2002 quando chegamos a Fortaleza.

Aos funcionários da Bahiana Edna, Marisete, Andréa e em especial Marise pelas madrugadas de trabalho.

Aos meus funcionários da Odontoclin Raulinda, Carmem, Genilda e Bárbara pela paciência em resolver meus horários e contornar minha ausência.

A Silvana, que mesmo eu estando na Bahia sempre tentou resolver o solicitado com presteza e dedicação.

Ao prof. Rommel Burbano e sua equipe pelo apoio a pesquisa.

Aos amigos do LOE Paula, Raquel, Diego, Gardênia, Macio, Michel, Carla, Patrícia Maçal.

Aos professores da pós-graduação pelo exemplo de dedicação.

A Aura e Márcia pelo carinho, atenção e disposição em resolver problemas, que Deus cuide bem de vocês.

A todos meus irmãos em Cristo pelas orações.

Agradeço a CNPq pelo apoio ao projeto

RESUMO

Biomonitoramento genético de indivíduos expostos ocupacionalmente a pesticidas no povoado Vila Bessa, município de Conceição do Jacuípe, Bahia. Maria Emilia Santos Pereira Ramos. Orientadora: Claudia do Ó Pessoa. Tese de Doutorado. Programa de Pós-graduação em Farmacologia. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, UFC, 2009.

O elevado consumo de pesticidas no Brasil e no mundo tem levado grupos de pesquisadores a relacionar essa exposição a possíveis danos genéticos e agravos a saúde do trabalhador rural. Estudos revelam que o câncer é considerado doença genética, vez que resulta do acúmulo de mutações em genes comprometidos com o controle da proliferação e da diferenciação celular ou de mutações em genes envolvidos com os mecanismos de reparo do DNA. O objetivo dessa estudo foi realizar um biomonitoramento genético em indivíduos expostos ocupacionalmente a pesticidas avaliando a ocorrências de danos cromossômicos, através do teste do Micronúcleo em células esfoliadas da mucosa bucal, teste Cometa e teste de Aberrações Cromossômicas em linfócitos de sangue periférico. Como também alterações hematológicas e hepáticas. A população estudada incluiu 32 agricultores moradores do povoado Vila Bessa, Conceição do Jacuípe, Bahia, expostos ocupacionalmente a pesticidas e 30 indivíduos controle, sem historia de exposição a pesticidas. O material para análise do teste do micronúcleo foi coletado por raspagem da mucosa bucal com escova cytobrush, confeccionado um esfregaço e posteriormente fixado em solução de metanol/ácido acético (3:1) e corados pelo método Feülgen/Fast Green, as lâminas foram analisadas em teste cego sob microscopia óptica em um mínimo de 1000 células/indivíduo. Para realização do teste Cometa e de Aberrações, cromossômicas e das alterações hematológicas e hepáticas foram coletadas 10 mL de sangue periférico. O teste Cometa foi executado de acordo com a metodologia descrita por Singh *et al.* (1988), foram contados 100 cometas por lâmina e classificados, por análise visual, dentre cinco categorias de danos (0, 1, 2, 3 e 4), e calculado o Índice e a Freqüência de dano. O teste de Aberrações Cromossômicas foi realizada através de culturas de linfócitos e obtenção de metáfases pela interrupção da citocinese das células. Foram analisados o hemograma, e as transaminases TGO, TGP E GGT que foram processados pelo laboratório de análise bioquímica de Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública. Não houve diferença significativa na ocorrência de micronúcleos entre os grupos avaliados ($p = 0,163$), mas alterações nucleares indicativos de apoptose e necrose foram encontradas significativamente no grupo exposto a pesticidas ($p = 0,001$), indicando que uma maior injúria celular do que simplesmente uma resposta a diferenciação e maturação do epitélio. Aberrações Cromossômicas numéricas (3,3%) foi encontrada significantivamente para o grupo exposto ($p = 0,001$), foram encontrados danos ao DNA avaliados pelo teste Cometa no score 1 ($p < 0,001$) no grupo exposto; além do Índice de Dano cromossômico com média \pm SEM 4.032 ± 0.3336 para o grupo controle e média \pm SEM 41.05 ± 3.227 para o grupo exposto a pesticida ($p < 0,0001$); e Freqüência de Dano: média \pm SEM grupo controle 4.081 ± 0.3667 e média \pm SEM grupo exposto a pesticida 38.44 ± 2.664 , com diferenças significativas para o grupo exposto ($p < 0,0001$). Os indivíduos pesquisados estão expostos ao glifosato e ao paration-metílico, ambos tóxicos para o organismo

humano, e apresentavam-se anêmicos ($p=0,004$) e com leucopenia ($p < 0,001$), porém sem alterações nas avaliações hepáticas. Concluímos que esses indivíduos estão expostos a agentes potencialmente genotóxicos, além de apresentarem alterações hematológicas, e que a persistência desse contato com os pesticidas poderá levar a desencadeamento dos fenômenos envolvidos na iniciação e promoção do câncer.

Palavras-chaves: Exposição ocupacional, pesticidas, alterações cromossômicas.

ABSTRACT

Genetic biomonitoring of individuals occupationally exposed to pesticides in the village Vila Bassa, municipality of Conceição do Jacuípe, Bahia. Maria Emília Santos Pereira Ramos. Orientadora: Claudia do Ó Pessoa. Tese de Doutorado. Programa de Pós-graduação em Farmacologia. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, UFC, 2009.

The high consumption of pesticides in Brazil and all over the world have lead researches to relate this exposition to possible genetic and health damages in rural workers. Studies reveal that cancer is considered a genetic disease, once it results of the mutation accrual in genes involved with control of proliferation and cellular differentiation or mutations in genes involved with the DNA repair. The aim of this study was realize a genetic biomonitoring in individuals occupationally exposed to pesticides evaluating the occurrence of chromosomal damages, by the Micronucleus assay in exfoliated cells of buccal mucosa, Comet assay and Chromosome Aberration assay in peripheral blood lymphocytes. Hematologic and hepatic alterations were also evaluated. The studied population included 32 agriculturists living in the village of Vila Bessa, Conceição do Jacuípe, Bahia, occupationally exposed to pesticides, and 30 control individuals, with no history of pesticides exposition. For the micronucleus assay, the material was collected by scaling buccal mucosa with a cytobrush, the smear was made and then fixed in methanol/acetic acid solution (3:1) and colored by Feülgen/Fast Green Method, slides were analyzed in blind test by optic microscopy in a minimum of 1000 cells/individual. To realize the assay of Comet and Aberration, Chromosomal and hematologic and hepatic alterations, were collected 10 mL of peripheral blood. Comet test was made according the methodology described by Singh *et al.* (1988), were counted 100 comet by slides and classified, by visual analyses, into five categories of damages (0, 1, 2, 3 e 4), and then calculated the index and frequency of damage. Chromosome Aberration test was realized with a lymphocytes culture and obtaining of metaphases by interrupting the cells cytokinesis. The hemogram and the transaminases TGO, TGP and GGT were analyzed; those were processed by the biochemical analyses laboratory of Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública. That wasn't statistical difference in the occurrence of micronucleus among the evaluated groups ($p = 0.163$), but nuclear alterations, indicative of apoptosis and necrosis, were significantly found in the pesticide exposed group ($p = 0.001$), indicating a major cellular injury than a simple answer to epithelium's differentiation and maturation. Numeric Chromosome Aberrations (3.3%) were significantly found in the exposed group ($p = 0.001$), were found DNA damages evaluated by the Comet assay in score 1 ($p < 0.001$) in the exposed group; as also index of chromosomal damage with media \pm SEM 4.032 ± 0.3336 to the control group and media \pm SEM 41.05 ± 3.227 to the pesticide exposed group ($p < 0.0001$); and frequency of damage: media \pm SEM control group 4.081 ± 0.3667 and media \pm SEM pesticide exposed group 38.44 ± 2.664 , with significant differences in the exposed group ($p < 0.0001$). The studied individuals are exposed to glifosate and methyl parathion, both toxic to the human organism, and were anemics ($p = 0.004$) and with leukopenia ($p < 0.001$), however with no alterations in hepatic evaluations. We conclude that these individuals are exposed to potentially

genotoxic agents, besides present hematologic alterations, and that the persistence of this contact with the pesticides can trigger to phenomenon's involved with cancer initiation and promotion.

Keywords: Occupational Exposure, pesticides, chromosome aberrations.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

R\$	Real
DDT	Dicloro-Difenil-Tricloroetano
AC	Aberrações Cromossômicas
MN	Micronúcleo
US\$	Dólar
Kg	Quilograma
hab	Habitante
%	Porcentagem
MS	Ministério da Saúde
1/20	Um vinte avos
1/5	Um quinto
H2O2	Peróxido de Hidrogênio
DNA	Ácido Desoxirribonucléico (ADN)
>	Maior que
<	Menor que
Km	Quilômetro
Km²	Quilômetro quadrado
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
HTLV	Human T lymphotropic virus
HPV	Human Papiloma Virus
EPI	Equipamento de Proteção Individual
INCA	Instituto Nacional do Câncer
ANOVA	Analisis of Variance (Análise de Variância)
mL	Mililitro
HCL	Ácido Clorídrico
KCL	Cloreto de Potássio
1/3	Um terço
rpm	Rotações por minuto
PBS	Phosphate buffer solution (Tamp
°C	Grau Celsius
mM	Milimolar

min	Minuto
µg	Micrograma
µL	Microlitro
L	Litro
mm³	Milímetro cúbico
pg	Picograma
U/L	Unidade por litro
UI/L	Unidades internacionais por litro
X_{id}	Média de idade
X²	Quiquadrado
GL	Grau de Liberdade
IC	Intervalo de confiança
g	Grama
H/E	Hematoxilina/Eosina
CO₂	Dióxido de carbono
SEM	Desvio padrão da média

LISTA DE TABELA

- Tabela 1 - Análises das medidas de idade entre os grupos estudados
- Tabela 2 - Distribuição dos sexos dos indivíduos separados por grupo
- Tabela 3 - Avaliação dos anos de escolaridade distribuídos nos grupos
- Tabela 3 - Avaliação do tempo de exposição no grupo exposto a pesticida
- Tabela 4 - Avaliação da ocorrência de alterações cromossômicas numéricas nos indivíduos expostos e não expostos aos pesticidas.
- Tabela 5 - Frequência de células com alterações cromossômicas numéricas de acordo com os indivíduos expostos e não exposto a pesticidas.
- Tabela 6 - Distribuição dos indivíduos segundo o número de alterações no grupo exposto
- Tabela 7 - Dados referentes à ocorrência de MN entre os Grupos Exposto e Controle
- Tabela 8 - Dados referentes à ocorrência de Cromatina Condensada entre os Grupos Exposto e Controle
- Tabela 9 - Dados referentes à ocorrência de Cariorréxis entre os Grupos Exposto e Controle
- Tabela 10 - Dados referentes à ocorrência de Cariólise entre os Grupos Exposto e Controle
- Tabela 11 - Dados referentes à ocorrência de Picnose entre os Grupos Exposto e Controle
- Tabela 12 - Dados referentes à ocorrência de Broken-eggs entre os Grupos Exposto e Controle
- Tabela 13 - Dados referentes à ocorrência de Necrose entre os Grupos Exposto e Controle
- Tabela 14 - Dados referentes à ocorrência de Apoptose entre os Grupos Exposto e Controle
- Tabela 15 - Avaliação das variáveis: hemácias, hemoglobina, hematócrito, VGM, HGM e CHGM segundo resultado abaixo, normal e acima do preconizado.

- Tabela 16 - Estatística das variáveis: hemácias, hemoglobina, hematócrito, VGM, HGM e CHGM segundo o grupo pesquisado
- Tabela 17 - Avaliação das variáveis, neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e monócitos segundo o grupo
- Tabela 18 - Análise estática das variáveis: leucócitos, neutrófilos, bastões, eosinófilos, linfócitos e monócitos segundo o grupo
- Tabela 19 - Avaliação da concentração de ferro e ferritina segundo o grupo
- Tabela 20 - Avaliação das variáveis: AST, ALT e GGT nos indivíduos expostos e não expostos e pesticida
- Tabela 21 - Estatística das variáveis: AST, ALT e GGT nos indivíduos expostos e não expostos a pesticida, segundo a média e mediana.
- Tabela 22 - Análise das variáveis: AST, ALT e GGT nos indivíduos expostos e não expostos e pesticida, que apresentavam valores considerados normais
- Tabela 23 - Parasitológico de fezes dos indivíduos expostos e não expostos a pesticidas
- Tabela 24 - Análise parcial da formação do micronúcleo (MN) pelo método de Fish para o grupo exposto.

LISTA DE FIGURA

- Figura 1 Formação de micronúcleo por eventos aneugênico e clastogênico.
- Figura 2 Mapa da microregião de Feira de Santana/Conceição do Jacuípe
- Figura 3 Sequência esquemática do Teste de Aberrações Cromossômicas em linfócitos de sangue periférico
- Figura 4 Estrutura e diferenciação do epitélio oral. A - Desenho esquemático das camadas das células da mucosa bucal e sua renovação celular; B – fotomicrografia da mucosa oral mostrando as várias camadas de células.
- Figura 5 A - Lâmina previamente identificada e com uma gota de soro fisiológico. B - Material coletado da mucosa bucal, utilizando escova cytobrush.
- Figura 6 C - Esfregação do material coletado. D - Fixação do material em metanol/ ac. acético (3:1)
- Figura 7 Preparações contra coradas com Fast green à 1%.
- Figura 8 Lâmina corada e pronta para leitura
- Figura 9 Desenho esquemático de célula com micronúcleo e das alterações nucleares observadas em células da mucosa oral nas preparações do Teste do Micronúcleo (Adaptado de Tolbert *et al.* 1991,1992)
- Figura 10 Método Cometa : A – isolamento dos linfócitos; B – Preparação das lâminas em agarose; C – Após lise celular ocorre a Eletroforese
- Figura 11 Tipos de Cometa: representação dos cometas corados com brometo de edítio. Sendo indicado o escore em que se atribui para cada cometa de acordo com o dano ao DNA.
- Figura 12 Fotografia de células esfoliadas de mucosa bucal: micronucleada (A), cariorréxis (B), cromatina condensada (C), picnose (D), broken-egg (E) e cariólise (D).

- Figura 13 Painel A - Índice de Dano: média \pm SEM 4.032 ± 0.3336 para o grupo controle e média \pm SEM 41.05 ± 3.227 para o grupo exposto a pesticida (* $p < 0,0001$ vs. controle). Painel B – Freqüência de Dano: média \pm SEM grupo controle 4.081 ± 0.3667 e média \pm SEM grupo exposto a pesticida 38.44 ± 2.664 (* $p < 0,0001$ vs. controle) . (teste t)
- Figura 14 Diagrama esquemático dos caminhos postulados para produzir corpos extra- nucleares contendo DNA . (Adaptado de Tolbert *et al.* 1991, 1992).
- Figura 15 Cromossomo inteiro (C + MN)
- Figura 16 Fragmento de Cromossomo (C – MN)

LISTA DE GRÁFICO

- Gráfico 1 Distribuição dos pesquisados do grupo exposto decorrente do uso ou não uso de EPI
- Gráfico 2 Distribuição dos indivíduos analisados segundo a ocorrência de sintomas após aplicação imediata do pesticida
- Gráfico 3 Ocorrência de cometas segundo o dano ao DNA (escore 0, 1, 2, 3 e 4) no grupo exposto a pesticida
- Gráfico 4 Ocorrência de cometas segundo o dano ao DNA (escore 0, 1, 2, 3 e 4) no grupo não exposto a pesticida
- Gráfico 5 Distribuição das células analisadas através do teste cometa segundo ocorrência de dano ao DNA (escore 0, 1, 2, 3 e 4) entre o grupo exposto e não exposto a pesticida

LISTA DE QUADRO

Quadro 1	Óbitos registrados por intoxicação humana na Bahia
Quadro 2	Classificação dos pesticidas segundo tipo de ação
Quadro 3	Classificação toxicológica de praguicidas quanto sua periculosidade
Quadro 4	Avaliação do tempo de exposição no grupo exposto a pesticida

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
1.1	Pesticida	21
1.1.1	Aspectos Gerais	21
1.1.2	Consumo Mundial e Brasileiro de Pesticida	22
1.1.3	Câncer decorrente da exposição à pesticida	24
1.1.4	Intoxicações Ocupacionais Causada por Exposição a Pesticida ...	26
1.1.5	Classificação dos pesticidas	29
1.2	Estudo genético de Biomonitoramento	30
1.2.1	Análise do Teste do Micronúcleo	32
1.2.2	Análise do Teste Cometa	35
1.2.3	Teste de Aberrações Cromossômicas	37
1.3	Local de Estudo (abordagem)	38
1.3.1	Microrregião de Feira de Santana – Bahia, tipos de pesticidas utilizados	38
1.3.2	Pesticidas Usados na Região de Feira de Santana	39
2	OBJETIVOS	42
2.1	Objetivo Geral	42
2.2	Objetivos Específicos	42
3	METODOLOGIA	43
3.1	Delineamento experimental	43
3.2	Crterios de Inclusão e Exclusão	43
3.3	Caracterização da amostra	44
3.4	Avaliação da Genotoxicidade e Citotoxicidade	45
3.4.1	Teste de Aberrações Cromossômicas em linfócitos de sangue periférico	45
3.4.1.1	Materiais	45
3.4.1.2	Método	46
3.4.1.3	Análise dos dados	48
3.4.2	Teste do micronúcleo em células esfoliadas de mucosa bucal	49
3.4.2.1	Materiais	49
3.4.2.2	Método	50

3.4.2.2.1	Protocolo experimental	50
3.4.2.3	Análise do micronúcleo e das alterações nucleares	52
3.4.2.4	Destino das células coletadas	53
3.4.2.5	Análise estatística	53
3.4.3	Teste Cometa em linfócitos de sangue periférico	54
3.4.3.1	Material	54
3.4.3.2	Método	55
3.4.3.2.1	Protocolo experimental	55
3.4.3.3	Análise dos dados	57
3.5	Método de Fish.....	58
3.5.1	Método	58
3.5.2	Análise dos dados	59
3.6	Avaliação Hematológica.....	59
3.6.1	Método	59
3.6.1.1	Protocolo experimental.....	59
3.6.2	Análise dos dados	60
3.7	Avaliação Bioquímica....	61
3.7.1	Método	61
3.7.2	Análise dos dados.....	61
3.8	Parasitológico de Fezes.....	62
3.8.1	Método	62
3.9	Aspectos éticos da pesquisa	62
4	RESULTADOS	64
4.1	Caracterização da População estudada	64
4.1.1	Análise das médias de Idade entre os grupos estudados	64
4.1.2	Prevalência do gênero estudado	65
4.1.3	Determinação Escolaridade	65
4.1.4	Tempo de trabalho na lavoura (Grupo Exposto)	66
4.1.5	Uso de Equipamento de Proteção Individual (EPI)	67
4.1.6	Sintomas após aplicação do pesticida	67
4.2	Avaliação da atividade genotóxica e citotóxica	68
4.2.1	Ocorrência de Aberrações Cromossômicas	68
4.2.2	Ocorrência de Micronúcleo	69
4.2.2.1	Ocorrência de Alterações Nucleares	70

4.2.3	Ocorrência de Cometas	74
4.3	Avaliação das Variáveis Hematológicas	78
4.3.1	Série Vermelha	78
4.3.2	Série Branca	81
4.3.3	Ferro e Ferrita	84
4.4	Alterações Hepáticas	84
4.4.1	Avaliação da AST,ALT e GGT	84
4.5	Parasitológico de Fezes	87
4.6	Pesticidas utilizados na lavoura	88
4.7	Resultados preliminares na formação do micronúcleo pelo método de Fish	88
5	DISCUSSÃO	90
6	CONCLUSÃO.....	109
7	REFERÊNCIAS	110
8	ANEXOS	131

1 - INTRODUÇÃO

1.1 Pesticida

1.1.1 Aspectos Gerais

O uso de substâncias químicas orgânicas ou inorgânicas em agricultura remonta a antigüidade clássica. Escritos de Romanos e Gregos mencionavam o uso de certos produtos como o arsênico e o enxofre para o controle de insetos nos primórdios da agricultura. (LUNA *et al.*, 2001). Quando, na década de 1920, níveis elevados de arsênico foram encontrados em frutas e vegetais, o uso intenso e disseminado de pesticidas arsênicos começou a ser percebido como um grave problema de Saúde Pública. Além de ser agudamente tóxico, pode-se dizer que o arsênico inorgânico foi uma das primeiras substâncias químicas para as quais o efeito carcinogênico em seres humanos foi bem estabelecido. (FERREIRA *et al.*, 2002) já, a partir da década de 40, mais especificamente a partir da Segunda Guerra Mundial, com a descoberta do alto poder inseticida do organoclorado DDT (Dicloro-Difenil-Tricloroetano) e do organofosforado Sharadam, inicialmente utilizado como arma de guerra, deu-se início à grande disseminação dessas substâncias na Agricultura. (LUNA *et al.*, 2001; ERGENE *et al.* 2007).

Desse modo, os pesticidas são resultados do antigo desejo do homem de livrar-se das pragas que invadem seu modo de vida. Mas, no mundo moderno, já é conhecida à outra face de algumas destas substâncias: são venenos perigosos para a saúde e o meio ambiente. Pesticidas constituem uma categoria heterogênea de substâncias químicas, especificamente designadas para o controle de pragas como insetos que atacam plantações e vetores de doenças, sendo, portanto, amplamente utilizados na agricultura e em campanhas de saúde pública (BOLOGNESI, 2003). A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (U.S. EPA) define pesticida como uma substância ou uma mistura de substâncias que previnem, destroem e repelem algum tipo de praga. No Brasil, o Decreto Federal nº 4.074 de 04 de janeiro de 2002, que regulamenta a Lei Federal nº 7.802, de 11 de julho de 1989, em seu Artigo 1º, Inciso IV, define o termo *agrotóxico* como produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas

pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas. Assim, agrotóxico é um termo genérico para uma variedade de agentes que tem o potencial de matar organismos. Ou seja, são substâncias utilizadas para combater as pragas (como insetos, larvas, fungos, carrapatos) e controlar o crescimento de vegetação, entre outras funções (Ministério da Saúde 2006). Os agrotóxicos possuem ainda diversas denominações genéricas, como “pesticidas”, “praguicidas”, “remédios de plantas” e “veneno” (PERES *et al*, 2005) e são atualmente responsáveis pelo comércio de bilhões de dólares em todo o mundo. (STOPPELLI; MAGALHÃES, 2005).

Em todo o mundo os pesticidas (organoclorados) têm sido utilizados extensivamente desde 1940 na proteção de plantações e em ações sanitárias que visam eliminar vetores que transmitam malária, febre tifóide, ectoparasitos humanos e proteção animais domésticos. (WALISZEWSKI *et al.*, 2005; BHALLI *et al.* 2006). Todos os pesticidas possuem um grau inerente de toxicidade para alguns organismos vivos; de outra forma não teriam uma utilidade prática. Infelizmente a especificidade dos pesticidas em relação às espécies alvo não está bem desenvolvida o quanto seria desejável e outras espécies acabam sendo afetadas por possuírem sistemas fisiológicos e bioquímicos semelhantes aos organismos alvo (KLASSEN 2001).

1.1.2 Consumo Mundial e Brasileiro de Pesticida

Os gastos mundiais com pesticida crescem continuamente. Passaram de US\$ 20 bilhões em 1983 para US\$ 34,1 bilhões ao longo dos anos 90. A América latina é a região onde mais cresceram as vendas. No Brasil foi observado um importante aumento de vendas nos anos 90, passando de 1 bilhão de dólares em 1990, para 2,18 bilhões de dólares em 1997 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

O Brasil supera em sete vezes a média mundial de 0,5 Kg/hab de veneno. A média desse país no início dos anos 80, era de 3,8Kg/hab, número esse que ficou maior em 1986, com a injeção temporária de recursos do plano cruzado. O consumo de agrotóxicos cresceu de 1964 para 1979, em 421%, enquanto que a produção das 15 principais culturas brasileiras, não ultrapassou o acréscimo de 5%. No período de 1964 a 1991, a área plantada cresceu 76% enquanto o consumo de agrotóxicos aumentou em 276%. As lavouras que mais se destacam no uso de agrotóxicos são

a soja, cana-de-açúcar, milho, café, citrus, arroz irrigado, algodão, fumo, batata, tomate, uva e morango. Estima-se que 40% das vendas de herbicidas no Brasil estejam concentradas nos estados de São Paulo e Paraná (FUNDAÇÃO IBGE, 2000).

Com esse tipo de consumo, o Brasil está entre os principais consumidores mundiais de agrotóxicos. Segundo dados do Sindicato Nacional da Indústria de Defensivos Agrícolas - SINDAG, em 2001 o país consumiu 328.413 toneladas de produtos formulados, correspondendo a 151.523 toneladas de ingredientes ativos. Desta forma, o Brasil aparece em 7º lugar no ranking dos dez principais países consumidores, que representam 70% do mercado mundial de agrotóxicos. O país é responsável pelo consumo de cerca de 50% da quantidade de agrotóxicos utilizados na América Latina (SINDAG; CANTARUTTI, 2005).

De acordo com o SINDAG em 2003, existiam no Brasil 648 produtos em linha de comercialização, sendo 34,4% de inseticidas, 30,8% de herbicidas, 22,8% de fungicidas, 4,9% de acaricidas e 7,1% de outros grupos químicos. Sendo que de janeiro a agosto de 2008, segundo dados do próprio SINDAG as vendas de defensivos tiveram alta de 36% em comparação a igual período do ano anterior, com sua movimentação acumulada de aproximadamente R\$ 6,48 bilhões, contra R\$ 4,758 bilhões de 2007, sendo 45% de herbicidas, 29% de inseticidas, 21% de fungicidas, 2% de acaricidas e 3% de outros grupos químicos.

A partir de 1998 foi estimado que cerca de 2 a 3 milhões de toneladas de agrotóxicos são utilizados a cada ano na agricultura (AGROFIT, 1998). Em 1973 a Organização Mundial de Saúde (OMS) estimou que anualmente ocorressem no mundo mais de 500.000 novos registros de intoxicações por pesticidas, com uma provável taxa de letalidade de 1%. Hoje se calcula que nos países em desenvolvimento ocorram cerca de 375.000 casos agudos de intoxicação humana por pesticidas, resultando em 10.000 mortes, o que corresponde a aproximadamente um caso por minutos e uma morte a cada hora (HENAO, 1987; FARIAS *et al.* 2007).

Novas tecnologias, muitas delas baseadas no uso extensivo de agentes químicos, foram disponibilizadas para o controle de doenças, aumento da produtividade e proteção contra insetos e outras pragas. Entretanto, essas novas facilidades não foram acompanhadas pela implementação de programas de

qualificação da força de trabalho, sobretudo nos países em desenvolvimento, expondo as comunidades rurais a um conjunto de riscos ainda desconhecidos, originado pelo uso extensivo de um grande número de substâncias químicas perigosas, e agravado por uma série de determinantes de ordem social. (MOREIRA *et al.*, 2002)

Nos últimos anos tem-se evidenciado o aumento do uso indiscriminado e abusivo dos agrotóxicos, associado a mudanças constantes no espectro dessas substâncias, principalmente as sintéticas. Dentre os numerosos fatores que contribuem para isto, é importante mencionar as alterações no comportamento dos insetos, a resistência aos praguicidas, a economia agrícola que não mostra aumento do seu rendimento apesar dos agrotóxicos, a não seletividade com efeitos nocivos sobre o ambiente, incluindo o homem e a pouca informação quanto aos problemas ecotoxicológicos por elas acarretados. (GURGEL, 1998)

No Brasil, problemas sociais como a urbanização acelerada e desorganizada verificada desde 1970 trouxe importante contribuição para a situação ora vigente no ambiente rural brasileiro, geralmente caracterizado pela falta de saneamento básico, suprimento de água potável, transporte, etc. O governo brasileiro tem, consistentemente, dado muito pouca atenção a esses problemas, optando por concentrar esforços na solução de problemas de ordem política e/ou econômica. Ao mesmo tempo, incentiva continuamente o aumento da produção agrícola, uma vez que a exportação de produtos agropecuários é responsável por 39% da balança comercial brasileira. (MOREIRA *et al.*, 2002).

1.1.3 Câncer decorrente da exposição à pesticida

Com o passar dos anos, especialmente depois de 1980, as intoxicações por estas substâncias foram surgindo e atualmente apresentam-se em uma curva crescente, principalmente entre os trabalhadores rurais expostos, como também entre pessoas que se contaminam através da ingestão de resíduos em alimentos (incluindo carnes, peixes, frutas e vegetais) e naqueles indivíduos envolvidos na sua fabricação (LEITE; TORRES, 2008). Assim como os riscos a saúde geral associadas a esse tipo de exposição e especificadamente o risco de câncer tem sido objeto de grande interesse científico (NUNES; TAJARA 1998; GARAJ-VRHOVAC; ZELJEZIC

2002). Estima-se que as taxas de intoxicações humanas no país sejam altas, dada a falta de controle no uso destas substâncias químicas tóxicas e o desconhecimento da população em geral sobre os riscos e perigos à saúde decorrentes, além da subnotificação (RIBEIRO *et al.* 2006).

A maioria dos cânceres está, sem sombra de dúvidas, relacionada a agentes etiológicos ambientais ou hereditários, tais como: mutações espontâneas, substâncias químicas, vírus, radiações ionizantes e bactérias. A susceptibilidade ao câncer pode se manifestar através das diferenças herdadas de uma classe especial de genes envolvidos com proliferação celular, apoptose e/ou sistema de reparo do DNA, ou decorrente de alterações somáticas na expressão desses mesmos genes (PERERA, 1997; INCA 2007)

A idéia de que substâncias químicas podem desencadear a formação de tumores é bem antiga. Em 1775, Sir Percival Pott, na Inglaterra, verificou cânceres no escroto de limpadores de chaminé, o que foi por ele relacionado ao contato destes com a fuligem e o carvão. Em 1876, na Alemanha, Volkman observou câncer de pele em trabalhadores que manipulavam alcatrão e hulha (POTT, 1987). Vinte anos mais tarde, em Frankfurt, Rehn relatou uma maior incidência de câncer de bexiga em pessoas que trabalhavam na seleção manual de cristais de anilina (FLECK, 1992).

Os pesticidas têm sido considerados mutagênicos químicos em potenciais. Dados experimentais revelam que vários ingredientes agroquímicos possuem propriedades mutagênicas induzindo mutação gênica, aberração cromossômica ou outras alterações no DNA. Em estudos de biomonitoramento, dano genético associado com pesticidas tem sido detectado para níveis de exposição alta, uso intensivo ou por causa do mau uso ou da falta de medidas de controle (GONZÁLES *et al.*, 1990; BOLOGNESI; MORASSO, 2000). Teste laboratoriais utilizando animais e testes *in vitro*, tem sido extensivamente utilizados em todo o mundo, para determinar os riscos próprios de cada pesticida para a saúde do homem. Porém segundo Burns, 2005, estudar o risco utilizando modelos animais, em que são utilizadas altas doses pode não ser relevante para humanos.

Alguns grupos de pesquisadores internacionais têm buscado estabelecer relações entre a exposição aos agrotóxicos e o desenvolvimento de alguns tipos de neoplasias, como: exposição a inseticidas organoclorados e câncer de mama, aumento do risco ao câncer pancreático, linfoma não-Hodgkin, leucemias, além de

câncer hepático (KOLAJA *et al.*, 1996; VIGREUX *et al.*, 1998; DEMERS *et al.*, 2000; STELLMAN *et al.*, 2000). Porém os estudos epidemiológicos com agricultores e aplicadores de pesticidas tem sido limitados por informações inadequadas a respeito do tipo de exposição (ALAVANJA; BONNER, 2005). Nos países desenvolvidos a relação entre câncer e o perfil de exposição na agricultura são bem administrados, situação muito diferente nos países menos desenvolvidos em que alguns fatores como uso incorreto do pesticida, a não execução das leis, baixa escolaridade e pressão no crescimento da produção de alimentos, leva ao consumo indiscriminado de agrotóxicos, demonstrando um crescimento muito rápido do setor e deve servir de alerta para a necessidade de estudos mais detalhados sobre o tema, principalmente no que diz respeito aos seus efeitos sobre a saúde humana (JAGA; DHARMANI, 2005).

1.1.4 Intoxicações Ocupacionais Causada por Exposição a Pesticida

No mundo a intoxicação atribuída à pesticidas tem sido estimada em três milhões de casos agudos, e severo envenenamento anual, com muitos casos não relatados, chegando a 220.000 mortes/ano (OMS, 1990; WHO 1992). Estima-se que a incidência de envenenamento seja 13 vezes maior em países em desenvolvimento do que em nações industrializadas, os quais consomem 85% da produção mundial de pesticida (FORGET, 1989, FORGET *et al.* 1993). Sendo que de acordo com a Organização Mundial de Saúde a cada caso notificado ter-se-ia 50 outros não notificados (SESA, 1997). Segundo a Organização Internacional das Uniões de Consumidores, a cada 4 horas morre um trabalhador agrícola nos países em desenvolvimento, por intoxicação por agrotóxicos. O grupo de produtos envolvido na maior parte das intoxicações é organofosforado (RIBEIRO; MELLA, 2007).

A magnitude do impacto resultante do uso de agrotóxicos sobre o homem do campo, no Brasil, pode ser apreendida a partir dos dados do Ministério da Saúde, onde de acordo com estes dados, em 1996 houve 8.904 casos de intoxicações por agrotóxicos, dos quais 1.892 (21,25%) foram observados no meio rural (SINITOX, 1998). Nos estudos do SINITOX de 1986-2003 ao considerar apenas os últimos cinco anos e os dados nacionais, pode-se verificar crescimento tanto do número de casos quanto do número de óbitos para as intoxicações por agrotóxicos de uso agrícola (27% e 6%, respectivamente), por produtos veterinários (137% e 38%,

respectivamente) e por agrotóxicos em geral (28% e 6%, respectivamente); crescimento do número de casos e manutenção do número de óbitos de intoxicação por raticidas (28%) e diminuição do número de casos com manutenção do número de óbitos de intoxicação por agrotóxicos de uso doméstico (4%). Esta mesma análise realizada para cada região mostra que, para a região Norte, Sul e Centro-Oeste o número de casos de intoxicação por raticidas foram os que mais cresceram (350%, 54% e 206% respectivamente), já para a região Nordeste, foram os por agrotóxicos de uso agrícola (164%) e para a região Sudeste, foram os por produtos veterinários (309%). (SINITOX, 2003).

No Brasil, o registro de exposições ocupacionais a esses pesticidas ainda é limitado. Atualmente existe o Sistema Nacional de Informações Toxicológicas (SINITOX), criado em 1980 pelo Ministério da Saúde (MS), tendo como sede a Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), cuja principal atividade é coordenar o processo de coleta, compilação, análise e divulgação dos casos de intoxicação humana registrados no país, pela Rede Nacional de Centros de Controle de Intoxicações (REDE SINITOX) (RAMOS; SILVA-FILHO, 2004).

Segundo o SINITOX, em estudo realizado entre o ano de 1989 a 2003, foram registrados no estado da Bahia em média 9 óbitos/ano por intoxicação humana por agrotóxicos (Quadro 1). Em 2003, foram registrados 35 casos de intoxicação ocupacional, sendo a terceira causa de intoxicação humana no estado da Bahia. A faixa etária mais atingida por esses agentes fica entre 15 a 29 anos, sendo que o maior número de casos ocorreu na área urbana.

Quadro 1: Óbitos registrados por intoxicação humana na Bahia

Ano	Óbito
1989	Sem registro
1990	11
1991	10
1992	1
1993	9
1994	11
1995	10
1996	20
1997	7

1998	10
1999	7
2000	6
2001	12
2002	7
2003	11

Fonte: SINITOX

Estes dados, entretanto, não refletem a real dimensão do problema uma vez que os mesmos advêm de Centros de Controle de Intoxicações, situados em centros urbanos, inexistentes em várias regiões produtoras importantes ou de difícil acesso para muitas populações rurais. (MOREIRA *et al.*, 2002).

A dificuldade de determinar taxas de doença por pesticidas é exemplificada pela dificuldade em calcular o número de casos de doença aguda por pesticida. (MCCAULEY *et al.*, 2006)

A ampla utilização desses produtos, o pouco conhecimento dos riscos associados a sua utilização crônica, o conseqüente desrespeito às normas básicas de segurança, a livre comercialização, a grande pressão comercial por parte das empresas distribuidoras e produtoras e os problemas sociais encontrados no meio rural constituem importantes causas que levam ao agravamento dos quadros de contaminação humana, determinando o uso de pesticidas como um dos maiores problemas de saúde pública no meio rural (PIMENTEL, 1996; PERES, 1999; OLIVEIRA-SILVA *et al.*, 2000).

Os trabalhadores da agricultura, sem dúvida, são o grupo mais sujeito aos efeitos danosos dos agrotóxicos. Tanto os que têm contato direto, entre eles os aplicadores, preparadores da calda alcoxarifes, como os de contato indireto expostos, podem apresentar efeitos agudos ou de longo prazo. O grupo de contato indireto, aqueles que realizam capinas, roçadas, desbastes, colheitas, são os de maior preocupação, pois não há respeito a períodos de reentrada nas lavouras; estes trabalhadores, muitas vezes, se expõem e se contaminam em maior grau do que o grupo de contato direto. A exposição humana aos agroquímicos, seja através de exposição ambiental ou ocupacional, raramente se limita a um único princípio ativo, assim também a população trabalhadora rural dificilmente se expõe a um único tipo de agrotóxico, portanto, o grande desafio para a Toxicologia nestas

próximas décadas será a avaliação de indivíduos com múltiplas exposições por muitos anos. (TRAPÉ, 2005).

Segundo Carvalho, 1991, entre os fatores possíveis causadores da elevação da absorção dos inseticidas destacam-se como mais importantes: inadequada proteção individual; uso irregular dos equipamentos; uso repetido da mesma roupa contaminada durante dias; os hábitos no ambiente de trabalho; a inobservância de técnicas corretas de aplicação, inclusive durante os períodos de elevada temperatura ambiental, facilitando uma maior volatilização do princípio ativo e a conseqüente contaminação do meio ambiente laboral. Nos estudos de Soares *et al.*, 2005, os principais fatores risco para a exposição são o não uso equipamento de proteção, lavagem de equipamentos em tanque de uso doméstico e uso de pulverizador costal manual.

É importante realçar que, com exceção de alguns grandes exportadores, a agricultura próxima dos grandes centros é de pequeno porte e uma atividade eminentemente familiar, em que adultos e crianças se ajudam mutuamente no trabalho. Isto faz com que as crianças e os jovens também estejam sujeitos a elevado risco de contaminação. Esse problema é ainda mais preocupante uma vez que pouco se sabe da ação de uma exposição continuada de pesticidas sobre o corpo humano e que várias substâncias utilizadas são suspeitas de apresentarem atividade genotóxica e carcinogênica. (MOREIRA *et al.*, 2002).

1.1.5 Classificação dos pesticidas

Estes produtos podem ser agrupados de diversas maneiras, e uma das mais utilizadas é a classificação segundo o grupo químico a que pertencem e o tipo de ação (natureza da praga controlada) (Ribeiro *et al.* 2006). Podendo ser classificados em: inseticidas, fungicidas, herbicidas, nematicidas, acaricidas, rodenticidas, moluscidas, formicidas, molusquicidas, fumigantes (com ação inseticida e bactericida) e reguladores e inibidores de crescimento, ressaltando que muitos agrotóxicos possuem mais de um tipo de ação. Dentre essas classes, as três principais, por representarem, em média, 94,8% do consumo mundial de agrotóxicos entre 1960/2003, são os inseticidas, fungicidas e herbicidas (MARTINELLI, 2003).

Quadro 2 : Classificação dos pesticidas segundo tipo de ação

Tipo de ação (Classe)	Principais grupos químicos	Produtos / substâncias
Inseticidas (controle de insetos, larvas e formigas)	Organofosforados	Azodrin, Malathion, Parathion, Nuvacron, Tamaron, Hostation, Lorsban
	Carbamatos	Carbaryl, Furadan, Lannate, Marshal
	Organoclorados ²	Aldrin, Endrin, DDT, BHC, Lindane
	Piretróides (sintéticos)	Decis, Piredam, Karate, Cipermetrina
Fungicidas (combate aos fungos)	Ditiocarbamatos	Maneb, Mancozeb, Dithane, Thiram, Manzate
	Organoestânicos	Brestan, Hokko Suzu
Herbicidas (combate à ervas daninhas)	Dicarboximidas	Orthocide, Captan
	Bipiridílios	Gramoxone, Paraquat, Reglone, Diquat
	Glicina substituída	Roundup, Glifosato
	Derivados do ácido fenoxiacético	Tordon, 2,4-D, 2,4,5-T 3
	Dinitrofenóis	Bromofenoxim, Dinoseb, DNOC
	Pentaclorofenol	Clorofen, Dowcide-G
	Ditiocarbamatos	Azodrin, Malathion, Parathion, Nuvacron, Tamaron, Hostation, Lorsban

Fonte: FUNASA, 1998; Peres, 1999; ANVISA, 2005.

Também podem ser classificados segundo a classe toxicológica, baseada na DL50 (Quadro 3).

Quadro 3 : Classificação toxicológica de praguicidas quanto sua periculosidade.

Classe	Categoria	DL 50 (mg/Kg)			
		Oral		Dérmica	
		Formulações		Formulações	
		Sólida	Líquida	Sólida	Líquidas
Ia	Extremamente Tóxico (tarja vermelha)	< 5	< 20	< 10	< 40
Ib	Altamente Tóxico (tarja amarela)	5 a 50	20 a 200	10 a 100	40 a 400
II	Moderadamente tóxico (tarja azul)	50 a 500	200 a 2000	100 a 1000	400 a 4000
III	Levemente tóxico (tarja verde)	> 500	> 2000	> 1000	> 4000

Fonte: SUCEN, 2001 apud OMS.

Disponível em: http://www.sucen.sp.gov.br/docs_tec/seguranca/cap11pra.pdf.

1.2 Estudo genético de Biomonitoramento

A maioria dos cânceres (quase 80% deles) está relacionada ao meio ambiente (geral: água, terra e ar, ocupacional, consumo: alimentos e medicamentos, e ambiente social e cultural: estilo e hábitos de vida). As mudanças provocadas no

meio ambiente pelo próprio homem, os "hábitos" e o "estilo de vida" adotados pelas pessoas, podem determinar diferentes tipos de câncer (INCA).

Os pesticidas, utilizados nas lavouras brasileiras e mundiais, têm sido considerados mutagênicos químicos em potenciais. Dados experimentais revelam que vários ingredientes agroquímicos possuem propriedades mutagênicas induzindo mutação gênica, aberração cromossômica ou outras alterações no DNA. Em estudos de biomonitoramento, dano genético associado com pesticidas tem sido detectado para níveis de exposição alta, uso intensivo ou por causa do mau uso ou da falta de medidas de controle (GONZÁLES *et al.*, 1990; BOLOGNESI; MORASSO, 2000).

A utilização de biomarcadores para investigações em saúde ambiental e ocupacional está aumentando devido à procura crescente de informações sobre riscos à saúde de indivíduos em exposição (KNUDSEN; HANSEN 2007). As pesquisas tem usado os testes de citogenética para avaliar o potencial genotóxico de populações expostas ocupacionalmente a pesticidas em vários países com uma gama de resultados. O aumento nos níveis de danos citogenéticos tem sido cada vez mais investigados para identificar o potencial de surgimento de doenças genéticas e câncer em populações expostas, sendo utilizados também para identificar fatores de risco e quais medidas poderiam ser implementadas para se controlar essas agressões a saúde humana (BOLOGNESI (2003); BHALLI (2006); BULL *et al.* (2006); MUNIZ *et al.*(2008)).

Na literatura internacional, há reportado vários estudos sobre os efeitos genotóxicos produzidos em trabalhadores por exposição a pesticidas. Historicamente desde 1974 e 1977 com as investigações de Alam *et al.*, e Seiler respectivamente, sobre possíveis anomalias genéticas induzidas por pesticidas em estudos *in vitro*, passando pelas investigações de Crossen e Morgan (1978) estudando a frequência de trocas de cromátides irmãs em linfócitos de sangue periférico até datas recentes em que se começou a se utilizar desde medula óssea de camundongos (KRISHNA *et al.* 1985) até células esfoliadas de mucosa bucal (BORTOLI *et al.*, 2009)

Nesse estudo, considera-se que a maioria das aberrações cromossômicas (AC) seja letal para as células que as carregam ou para as células filhas. Se não houver perda de material genético, a célula poderá sobreviver à divisão celular e transmiti-la às gerações futuras (WHO, 1985). Segundo Kucerova *et al.* (1982),

teoricamente, as AC em linfócitos podem servir como um indicador de carcinogenicidade e de aumento de patogenia genética na progênie. Deste modo, o controle citogenético através do teste de AC assume um papel importantíssimo na análise qualitativa da mutagenicidade provocada pela exposição à população de compostos químicos, como pesticidas (ERGENE *et al.* 2007; BONASSI *et al.* 2008). Assim como a utilização de outros testes como o Micronúcleo em linfócito de sangue periférico e em células esfoliadas de mucosa bucal em predizer o aumento do risco de câncer (IARMARCOVAI *et al.*,2007; HOLLAND *et al.*,2009), e o teste cometa que é considerado com sendo um teste rápido e sensível para detectar danos ao DNA causados por diferentes compostos (TICE *et al.*,2000; FAUST *et al.*,2004; BHALLI *et al.*,2009).

A complexidade no assunto e a ausência precisa de conhecimento sobre os riscos para a saúde de indivíduos expostos a pesticidas no trabalho bem como a falta de políticas educacionais, são fatores primordiais para o encaminhamento dessa pesquisa.

1.2.1 Análise do Teste do Micronúcleo

Os primeiros estudos em que se utilizaram as freqüências de micronúcleos em células esfoliadas foram realizados por Stich *et al.* 1982 avaliando em células esfoliadas de mucosa bucal de indivíduos que faziam uso do tabaco e associando ao risco de câncer, e também em 1982 Stich e colaboradores correlacionaram o uso do betel (consumido da Ásia, em especial na Índia) e a elevada freqüência de micronúcleos nos indivíduos com alto risco de câncer oral. Neste mesmo período Stich e Rosin (1983) avaliaram a freqüência dos micronúcleos em mucosa bucal em indivíduos que fumavam e consumiam bebidas alcoólicas, não encontrando diferenças nas freqüências entre fumantes e não fumantes, mas identificaram efeito sinérgico do cigarro e do álcool sobre estas freqüências. Porém já em 1987 Sarto *et al.* encontraram diferenças nas freqüências de micronúcleos entre fumantes e não fumantes.

Dessa maneira, a existência de micronúcleos tem sido reconhecida por muitos anos, e estão associados a danos cromossômicos. O índice de micronúcleos tem sido utilizados na genética toxicológica para avaliar danos genéticos (quebras ou perdas cromossômicas) *in vivo* ou *ex vivo*. Em humanos podem ser facilmente

avaliados em eritrócitos, linfócitos, e células esfoliadas epiteliais (mucosa nasal, bucal, urotelial etc.). Os micronúcleos são estruturas cromatínicas, visíveis em células interfásicas, que têm origem a partir de fragmentos cromossômicos ou de cromossomos inteiros que por não se ligarem ao fuso mitótico não são incluídos nos núcleos das células filhas quando da divisão celular. Os micronúcleos são tipicamente arredondados, medindo diâmetro menor que 1/3 do núcleo (SCHMID, 1976; HEDDLE *et al.*, 1983; RABELLO-GAY, 1991) (Figura 1). O Teste do Micronúcleo é um ensaio rápido, eficaz, portanto, na detecção de danos cromossômicos induzidos por agentes clastogênicos ou por agentes que interferem na formação do fuso mitótico, os denominados agentes aneugênicos (SCHMID, 1975; JENSSEN; RAMEL 1980; HOLLAND *et al.* 2008).

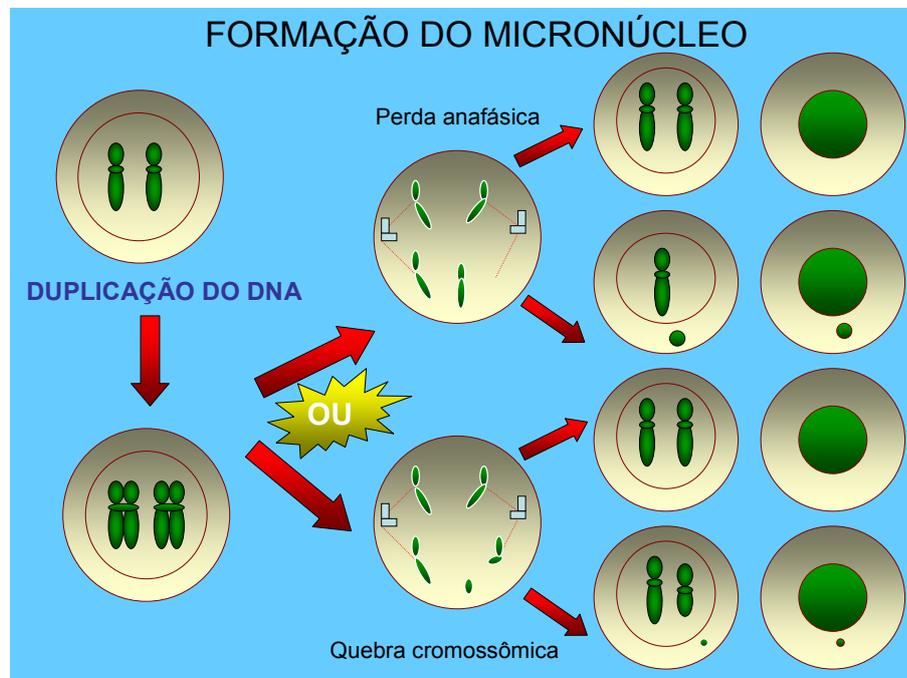


Figura1: Formação de micronúcleo por eventos aneugênico e clastogênico. (Ilustração cedida pela Profa. Dra. Eneida Moraes de Marcílio Cerqueira).

Assim, em 1983 Stich e colaboradores propuseram o teste do Micronúcleo em células esfoliadas de mucosa bucal, hoje considerado um excelente biomarcador para estudos de populações expostas a agentes potencialmente genotóxico e carcinogênico, com numerosas aplicações (Holland *et al.*, 2008). Segundo Pincu *et al.* (1984) e Stich e Rosin (1984) a utilização do teste em linfócitos de sangue periférico e em células esfoliadas poderia prever danos genéticos de forma sistêmica ou em um local específico de exposição.

O teste MN pode ser executado em células esfoliadas bucais e de outras de células de divisão celular rápida, sem a necessidade em *ex vivo* da divisão nuclear, necessária para as culturas de células para testes como de Aberrações Cromossômicas e Troca de Cromátides Irmãs. As células bucais são consideradas a primeira linha de barreira para inalação ou ingestão de produtos supostamente genotóxico ou carcinogênicos, podendo metabolizá-los em produtos reativos, lembrando que aproximadamente 90% dos cânceres humanos são de origem epitelial pode-se supor deste modo que as células epiteliais da mucosa bucal podem representar um local inicial para que eventos genotóxicos ocorram, induzidos após contato por inalação ou ingestão (ROSIN 1992; SPIVACK *et al.* 2004).

Atualmente, o uso do Teste de Micronúcleo em células de mucosa bucal tem sido utilizado para se avaliar múltiplos fatores, incluindo exposições ambientais (produtos petroquímicos, arsênio, mercúrio, etc.) e ocupacionais (pesticidas, óxido de eliteno, formaldeído, produtos petroquímicos, manipuladores de drogas antineoplásicas, operadores de máquinas xerox, etc.), radioterapia, quimioprevenção, teste de suplementação vitamínica, estilo de vida (hábitos de fumar, consumir bebidas alcoólicas, estresse, etc.) câncer e outras doenças (MACHADO-SANTELLI *et al.*, 1994; MARTINO-ROTH *et al.*, 2002; VARONA *et al.* 2003; RAY *et al.* 2005; CELIK; KANIK 2006; SPEIT *et al.* 2007; REMOR *et al.* 2008; HOLLAND *et al.*, 2008; BORTOLI *et al.*, 2009; HALLARE *et al.* 2009). Além de se investigar conjuntamente ao micronúcleo alterações nucleares (cariólise, cariorrexis, broken egg, cromatina condensada, picnose) indicativos de injúria celular, apoptose e necrose, eventos estes associados a respostas de citotoxicidade ou um evento secundário a genotoxicidade (TOLBERT *et al.* 1991; TOLBERT *et al.* 1992; ERGENE *et al.* 2007; HOLLAND *et al.* 2008; MARTINS *et al.* 2009)

1.2.2 Análise do Teste Cometa

O Teste Cometa é freqüentemente usado para mensurar danos no DNA das células individuais. Este teste não é utilizado para detectar mutações, mas lesões genômicas que, após serem processadas, podem resultar em mutação. Diferentemente dos testes de mutagenicidade, o teste cometa detecta lesões que são passíveis de correção. O Teste Cometa baseia-se no comportamento do DNA

na célula, no que diz respeito a sua organização dentro do núcleo. Por ser compacto o DNA, após seu enovelamento com proteínas histônicas, forma alças aderidas a uma rede protéica ou “matriz nuclear”. Se células embebidas em agarose tiverem suas membranas lisadas por detergentes e suas proteínas nucleares extraídas com altas concentrações de sais, o DNA, maior e mais pesado que o restante dos componentes, ocupará o espaço no gel anteriormente preenchido por toda célula, permanecendo retido numa estrutura residual semelhante a um núcleo, designada “nucleóide”, considerado este, como uma série de alças supernovelada de DNA desprovido de histonas, aderidas à matriz nuclear residual (GONTIJO, 2003). O cometa obtido depois da eletroforese, parece consistir laços de DNA no qual são estruturas ligadas ao núcleo (KLAUDE *et al.*, 1996).

Usando as vantagens do *fluorescent halo assay*, Ostling e Johanson (1984), desenvolveram um método baseado, no fato que, células individualizadas, embebidas em agarose e posteriormente lisadas, eram expostas a uma “microeletroforese” que fazia com que o DNA migrasse para o ânodo devido a sua carga negativa. Assim alças relaxadas e/ou DNA danificado migrariam para além do nucleóide, método chamado de microgel (OSTLING; JOHANSON, 1987). A técnica foi modificada por Sing *et al.* (1988) que usava eletroforese alcalina para analisar mudanças no DNA após tratamento com raio X ou H₂O₂. A aparência de cada nucleóide, semelhante a um cometa, quando submetido à eletroforese, ou seja, com seu DNA danificado levou Olive (1989) a sugerir o nome *comet assay* (teste cometa). Sing *et al.* (1988) e Olive *et al.* (1990) introduziram, independente e paralelamente, algumas modificações no protocolo do teste cometa, as quais incluíam digestão protéica mais completa e a alcalinização da solução de lise e de eletroforese, essas modificações possibilitaram a identificação de quebras de fita simples, sítios álcis lábeis e crosslinks no DNA, além das quebras de dupla-fita, já visualizada com o protocolo de Ostling e Johanson (1984; 1987) (KLAUDE *et al.* 1996; GONTIJO, 2003).

Esse teste, atualmente é considerado como sendo um teste de técnica rápida e sensível em detectar a presença de danos ao DNA (MCKELVEY-MARTIN *et al.* 1993; GROVER *et al.* 2009), que pode ser aplicado a uma ampla variedade de órgãos, desde que se possa obter material viável para a realização do teste (MIYAMAE *et al.*, 1998; PATEL *et al.* 2006). Quando se utiliza linfócitos humanos, é

um teste particularmente útil para detectar *in vitro*, as ações genotóxica de drogas e realizar estudos de biomonitoramento humano (HARTMANN *et al.* 1994; ANDERSON *et al.* 1994; MARCZYNSKI *et al.* 2002; CREBELLI *et al.* 2002; BASARAN *et al.* 2003; FAUST *et al.* 2004; PRABHAVATHY *et al.* 2006; MUNIZ *et al.* 2008; SILVA *et al.* 2008). De fato, o número de investigações, a compostos suspeitos de genotoxicidade, usando essa técnica tem crescido quase exponencialmente (TICE *et al.*, 2000; FENG *et al.* 2005; MCCAULEY *et al.* 2008).

O Teste Cometa foi comparado com outros testes de genotoxicidade por Tice *et al.* (2000), que identificaram as vantagens dessa técnica como demonstra sensibilidade para detectar baixos níveis de danos ao DNA; requer pequeno número de células por amostra; flexibilidade; baixo custo; facilidade de aplicação; habilidade para conduzir os estudos usando relativamente pequena quantidade da substância teste; relativamente pequeno período de tempo (poucos dias) necessário para completar o experimento. E nos estudos comparativos realizados He *et al.* (2000) entre teste cometa e micronúcleo com bloqueio de citocinese eles observaram uma correlação dos resultados obtidos após exposição das células (linfócitos) a radiação X, porém a sensibilidade do teste cometa foi significativamente maior que o teste de micronúcleo.

Durante os últimos anos, o Teste Cometa tem sido utilizado basicamente como ferramenta para as pesquisa humanas e para investigações de biomonitoramento ambiental nos processos de reparo do DNA na genética toxicológica. Considerado como um teste atrativo devido ser potencialmente completo; poder ser utilizado como método para distinguir entre genotoxicidade e citotoxicidade induzidas por danos cromossomais; é atualmente identificado como parte da bateria de testes *in vivo/in vitro* usado para considerações regulatórias (MERK; SPEIT 1999; TICE *et al.* 2000; BHALLI *et al.* 2006; SIMONIELLO *et al.* 2008; KISBY *et al.* 2009). Além de se poder utilizá-lo também, como um método não invasivo, quando se utiliza células bucais esfoliadas, como demonstrou Szeto *et al.* (2005) desenvolvendo um modelo de avaliação para quantificar lesões ao DNA em populações expostas a mutágenos e investigações de estado nutricional.

1.2.3 Teste de Aberrações Cromossômicas

As aberrações cromossômicas (AC) são mudanças microscopicamente visíveis na estrutura do cromossomo que envolve uma quebra ou rearranjo do material cromossômico (WHO, 1985).

As primeiras investigações utilizando o teste de aberrações cromossômicas retratam a década se 60, onde o teste foi utilizado para: investigar cariótipos aberrantes em uma família de animais (NADLER; HUGHES 1966); avaliar o número de aberrações cromossômicas na medula óssea de ratos irradiados continuamente (CHLEBOVSKY *et al.* 1966); e biomonitorar um indivíduo tratado extensivamente com uma droga durante um período de 4 anos para a esquizofrenia paranóide, após ter sido constatado em cultura de linfócitos um aumento de anormalidades cromossômicas, e concluíram com essa investigação que havia um aumento semelhante em danos cromossômicos (COHEN *et al.* 1967). Também nesse período inicial as pesquisas realizadas por Scott e Evans (1967) evidenciaram os danos causados pela radiação X em células de *vicia faba* observando a presença de aberrações cromossômicas nas mesmas.

Após esse período inicial o teste de AC passou a ser extensamente utilizado como um excelente biomarcador por apresentar um valor importante em prever efeitos adversos a saúde humana, incluindo o risco de câncer, no entanto pode ser limitado seu uso em virtude de ser considerado um método trabalhoso, delicado e com poucos profissionais treinados para sua perfeita execução (KNUDSEN; HANSEN, 2007). No entanto muito tem-se pesquisado agressões ao DNA utilizando o teste de AC, desde ensaios *in vitro* e *in vivo*, com vários objetivos desde avaliação de drogas com potencial mutagênico até exposição ambiental e ocupacional (ALAM *et al.* 1974; GARAJ-VRHOVAC; ZELIEZIC 2001; ZELJEZIC; GARAJ-VRHOVAC *et al.* 2004; KIRKLAND *et al.* 2005; SAILAJA *et al.* 2006; GÜVEN *et al.* 2006; THYBAUD *et al.* 2007; DAS *et al.* 2007; PIRTSKHELANI *et al.* 2008; GROVER *et al.* 2009; MILACIC 2009; TAVARES *et al.* 2009; GEORGE *et al.* 2009; HOLECKOVÁ *et al.* 2009; ROSSI *et al.* 2009).

Vários estudos confirmam essa excelente performance do teste de AC. Em um estudo realizado Ramirez e Abarca (1993), com roedores, mostrou que a medula óssea analisada apresentava diferenças significantes ($p < 0,05$) na frequência das aberrações cromossômicas em roedores da área exposta a poluentes ambientais (2,46% das células) quando comparadas as dos roedores da área controle (0,82 das células), confirmando que a contaminação ambiental pode

aumentar as lesões ao DNA. Varona *et al.* (2003) estudando a exposição ocupacional de floricultores a pesticidas, puderam identificar lesões ao DNA dos indivíduos expostos quando comparados ao não expostos através das frequências de AC, que apresentavam diferenças significantes. Entretanto Heepchantree *et al.* (2005) comparando indivíduos que moravam em uma área de alto risco para câncer de pulmão com indivíduos que não apresentavam esse mesmo risco, concluíram após avaliação das frequências de AC que não haviam diferenças estatisticamente significante entre as populações estudadas. Sailaja *et al.* (2006) investigando os efeitos genotóxicos ligados a exposição ocupacional de indivíduos que trabalhavam na produção de pesticidas, puderam observar que essa exposição ocasionou um aumento estatisticamente significativo de aberrações cromossômicas quando comparados ao grupo controle (indivíduos não expostos).

Avaliando os danos causados por agrotóxicos sobre a saúde humana Das *et al.* (2007) avaliaram *in vitro* a citotoxicidade e genotoxicidade através do teste de AC e teste cometa, de três misturas de pesticidas. Observaram danos significativos ao DNA e os resultados sugerem que a análise de genotoxicidade pode servir como um marcador biológico importante para a saúde humana e a exposição a pesticidas domésticos, especialmente misturas de pesticidas, com diferentes modos de ação.

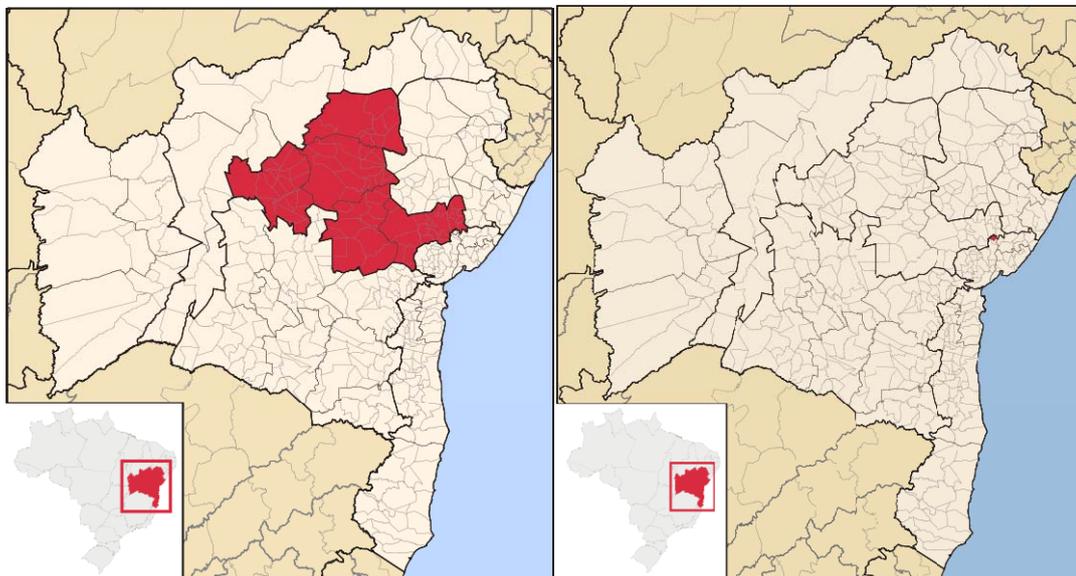
1.3 - Local de Estudo (abordagem)

1.3.1 Microrregião de Feira de Santana – Bahia, tipos de pesticidas utilizados

A microrregião de Feira de Santana (Figura 2) localiza-se na mesoregião do Centro Norte Baiano, compreendendo os municípios de Água Fria, Conceição da Feira, Elísio Medrado, Ipirá, Ouriçangas, Rafael Jambeiro, Santa Teresinha, Serra Preta, Anguera, Feira de Santana, Conceição do Jacuípe, Irará, Pedrão, Santa Bárbara, Santo Estevão, Tanquinho, Antônio Cardoso, Itatim, Coração de Maria, Ipecaetá, Pintadas, Santanópolis, São Gonçalo dos Campos, Teodoro Sampaio. A cidade de Conceição do Jacuípe tem uma população de 28.255 habitantes, área total de 116 Km², e densidade demográfica de 243,5 hab/Km² (FUNDAÇÃO IBGE). Apresentando como principal produção agrícola o cultivo de hortaliça folhosa,

principalmente na zona rural, entre elas a Vila do Bessa, município de Conceição do Jacuípe.

Figura 2: Mapa da microrregião de Feira de Santana/Conceição do Jacuípe



Fonte: commons.wikimedia.org/wiki/File:Bahia_MunicipConceicaodo_jacuipe.svg

1.3.2 Pesticidas usados na Região de Feira de Santana

Os agricultores dessa localidade utilizam amplamente pesticidas, decorrente da necessidade de controle de pragas, mantendo dessa forma, uma produtividade que leva ao sustento das suas famílias. Existem dois principais grupos de pesticidas os organoclorados e os organofosforados. Os organoclorados podem ser introduzidos no organismo através das vias cutânea, digestiva e respiratória (DEL GRANDE; REZENDE, 2003). A eficiência da absorção dermal é variável. Os hexaclorocicloexanos, incluindo o Lindano, e ciclodienos, como Aldrin, Dieldrin, Endrin e Endossulfan, são eficientemente absorvidos quando em contato com a pele. No entanto, a maior absorção pelo organismo de produtos, como o DDT e Dicofol, ocorre através dos alimentos, principalmente com os que contêm elevada quantidade de gordura. Além dos alimentos, a absorção dos pesticidas pode ocorrer através da via respiratória, que absorve as partículas de pó de pesticidas que estejam no ar (FERNÍCOLA, 1985; CHEREMISINOFF; KING, 1994). Os organofosforados são

substâncias que reagem com as enzimas que possuem resíduos do aminoácido serina (enzimas de serina) no sítio ativo, entre elas a acetilcolinesterase, que decompõe a acetilcolina após a transmissão do impulso nervoso de um neurônio a outro.

O Folisuper 600BR® é um acaricida e inseticida fabricado pela Agripec, tem como ingrediente ativo o paration-metilico pertencente a família os organofosforados. O Folisuper® é inibidor da colinesterase classificado pelo fabricante como extremamente tóxico. Os organofosforados são derivados do ácido Fosfórico e têm propriedades apolares, isso implica que não se dissolvem bem na água e sim na gordura, e se caracterizam por sua alta lipossolubilidade e baixa hidrossolubilidade. Assim, a pele por possui uma grande quantidade de moléculas lipídicas, se torna uma importante via de entrada dessas substâncias. Os organofosforados também são absorvidos por via respiratória e digestiva. A absorção dérmica é a principal via de penetração nas exposições ocupacionais, sendo tão tóxica como a via oral. (SUCEN, 2001). É importante ressaltar que mais de 90% da absorção se dá pela pele e o restante pela via digestiva, pois as gotículas das pulverizações não são inaláveis por serem grandes e acabam sendo deglutidas quando estão nas vias aéreas superiores (nariz, garganta, faringe) (TRAPÉ, 2005).

O outro pesticida utilizado é o Roundup® um herbicida fabricado pela Monsanto, tem como princípio ativo o glifosato classificado como pouco tóxico, segundo o fabricante. São usados no combate a ervas daninhas. Nas últimas duas décadas, esse tem tido sua utilização crescente na agricultura. Sua absorção é feita principalmente pela via digestiva e dérmica. Ele é metabolizado em ácido aminometil fosfônico que se torna mais nocivo que o glifosato, causando alguns sintomas como irritações, dor de cabeça, náuseas, elevação da pressão arterial. Existem também várias suspeitas de mutagenicidade, teratogenicidade e carcinogenicidade relacionados a estes produtos (RIBEIRO *et al.* 2006).

Dados disponíveis pela Secretaria de Saúde do Estado da Bahia sobre a microrregião de Feira de Santana, cidade de Conceição do Jacuípe são insuficientes no esclarecimento de informações acerca do uso, dos casos de intoxicações e das conseqüências da exposição aos agrotóxicos. Revelam, entretanto, que o uso excessivo de pesticidas, aponta para a necessidade de realização de uma ação intersetorial no sentido da avaliação e gestão de risco dos indivíduos, assim como preservação do meio ambiente. Comprovadamente o uso

de pesticidas leva a agravos à saúde do lavrador, chamando atenção para as neoplasias malignas que na sua grande maioria está diretamente relacionada com fatores ambientais de natureza química de exposição crônica, fazendo-se necessário estabelecer uma rotina de biomonitoramento dessa população, de modo que se possam identificar precocemente esses agravos, e não somente após a sua instalação. Reduzindo, deste modo, a morbidade, custo social e mortalidade ligada ao uso de pesticidas.

2- OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Realizar um biomonitoramento genotóxico da população exposta ocupacionalmente a pesticidas no Povoado Vila Bessa, zona rural do município de Conceição do Jacuípe, Bahia.

2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar a população exposta em relação á idade, sexo, aos pesticida(s) utilizado(s), tempo de atividade na lavoura, uso de Equipamentos de Proteção Individual (EPI) e grau de escolaridade;
- Estimar as aberrações cromossômicas numéricas presentes no cariótipo dos trabalhadores expostos cronicamente a pesticidas;
- Determinar a frequência de micronúcleos em células esfoliadas da mucosa bucal, dos agricultores expostos cronicamente a pesticidas;
- Investigar, através do uso do Teste do Micronúcleo em células esfoliadas da mucosa bucal, alterações nucleares como: *broken-eggs*, picnose, cromatina condensada, cariólise e cariorréxis;
- Estimar o dano ao DNA em linfócitos sanguíneos periféricos dos agricultores expostos cronicamente a agrotóxicos, pelo Teste Cometa;
- Identificar alterações qualitativas e quantitativas de leucócitos e eritrócitos, e o teor de hemoglobina;
- Identificar alterações das enzimas hepáticas nos níveis de AST (Transaminase Glutâmica Oxalacética) , nos níveis de ALT (Transaminase Glutâmico Pirúvica) e nos níveis de γ -Glutamil-Transferase (γ GT ou GGT);

3 - METODOLOGIA

3.1 Delineamento experimental

A população estudada foi constituída por um total 63 indivíduos. Para a investigação do grupo exposto, selecionou-se 32 indivíduos residentes do Povoado Vila Bessa, pertencente ao município de Conceição do Jacuípe - Bahia, que tem como atividade a lavoura de hortaliças folhosas onde é empregado rotineiramente pesticidas. O grupo controle foi composto de 31 indivíduos residentes na cidade de Salvador - Bahia que dista 83 Km da Villa Bessa, porém sem história de exposição ocupacional a pesticidas. Nesta área que envolve o recôncavo bahiano e região centro norte bahiano não existem cultivos sem uso de pesticidas.

Com o objetivo de uniformizar quantitativamente a população estudada quanto ao grau de exposição aos pesticidas, o presente estudo limitou o grupo pesquisado somente aos indivíduos que trabalhavam e moravam no povoado da Vila Bessa (Anexo C1). Quanto ao grupo de comparação externa foi selecionado na cidade de Salvador, indivíduos que apresentavam condições sócio-econômicas semelhantes (até um salário mínimo).

3.2 Critérios de Inclusão e Exclusão

✓ Critérios de Inclusão:

Estipulou-se que seriam incluídos indivíduos homens e mulheres de 18 a 60 anos de idade, período considerado produtivo da vida humana e que estivessem trabalhando por mais de 01 ano na lavoura com pesticidas, com uso ou não de equipamentos de proteção.

✓ Critérios de Exclusão:

A presente pesquisa teve como condições obrigatórias selecionar indivíduos saudáveis e que não apresentavam historia de etilismo e tabagismo, hábitos sociais que em existem a probabilidade de alterações a nível do DNA e diminuição do mecanismo de seu reparo, tornando as células geneticamente mais susceptíveis a agressões ambientais (BOLOGNESI 2003). Também foram excluídos os indivíduos

que em algum momento de suas vidas já desenvolveram algumas doenças que sabidamente estão relacionadas com alterações gênicas e cromossômicas de origem biológica (câncer, tuberculose, toxoplasmose, rubéola, citomegalovirus, AIDS, HTLV, HPV) (TRIPPI *et al.* 2001; SMEETS *et al.* 2009). Partindo desse mesmo ponto foram excluídos os que haviam sido submetidos a tratamentos radioterápicos, e quimioterápicos, e que estavam fazendo uso de antibióticos, antiarrítmicos (propranolol, por exemplo), anticonvulsivantes (tipo fenitoína e carbamazepina), antihipertensivos (metildopa e captopril), cortisona, hipoglicemiantes e medicamentos prescrito para controle da tireóide (NICHOLS, 1984; BIGATTI *et al.* 1998). Os indivíduos que depois de uma avaliação clínica bucal apresentaram lesões na cavidade oral foram excluídos pela possível relação direta dessas lesões com alterações genômicas (DÓREA, 2007).

3.3 Caracterização da amostra

Questionário contendo indagações a respeito de idade, sexo, hábitos de higiene bucal, hábito de fumar, ingestão de bebidas alcoólicas, uso de medicamentos, exposição a agentes genotóxicos conhecidos, nível de escolaridade, ocupação atual e anterior, tempo de trabalho na lavoura e uso ou não de Equipamentos de Produção Individual (EPI) (para o grupo exposto) e tipo de pesticida utilizado, foi aplicado individualmente a todos os pesquisados (Anexo C.3).

A coleta de dados através de questionário, é um valioso instrumento, uma vez que permite a obtenção de informações diretamente do entrevistado, sendo preenchido pelo pesquisador à medida que as informações são obtidas. O questionário pode ser aplicado a todo segmento da população e, as possíveis dúvidas do pesquisado podem ser esclarecidas pelo pesquisador, facilitando o seu entendimento (FACHIN, 2003; MARCONI; LAKATO, 2005)

Durante o processo de arguição foi seguida uma seqüência pré-determinada para todos os itens, onde as respostas foram preenchidas em sua totalidade no próprio local da entrevista (no local de trabalho). Ao realizar as perguntas, o entrevistador colocou-se de maneira passiva, limitando-se a ler estritamente o texto, para que não houvesse diferentes formas de interpretação do assunto questionado. Antes do entrevistado dar sua resposta, o entrevistador leu pausadamente todas as alternativas existentes. Em caso de dúvida, era relido novamente a questão,

evitando uma explicação sugestionada. Diante de todos esses cuidados, acredita-se que a seleção dos pesquisados foi a mais imparcial possível, selecionando somente as pessoas aptas a participarem da pesquisa.

Toda a população investigada foi submetida a exame clínico bucal com a finalidade de excluir aqueles indivíduos que apresentem lesões bucais (Anexo C.4). Toda a coleta de material para análise foi realizada no local de trabalho de ambos os grupos, sem a necessidade de locomoção por partes dos pesquisados.

3.4 Avaliação da Genotoxicidade e Citotoxicidade

3.4.1 Teste de Aberrações Cromossômicas em linfócitos de sangue periférico

3.4.1.1 Materiais

Aparelhos e Instrumentos Laboratoriais;

- Béqueres (SIMAX);
- Centrífuga;
- Cubas;
- Caixas para guardar lâminas;
- Estante suporte para tubos de centrífuga;
- Lâminas e lamínulas para microscopia;
- Microscópio óptico binocular (EMBRAEME);
- Pipeta de Pasteur com pipetador
- Seringas descartáveis 1 mL;
- Seringas descartáveis de 10 mL e agulhas de 25 x 7;
- Tubos de ensaio de vidro (PIREX);
- Tubos para centrífuga 15 mL (Laborglas);
- Tubo falcon 15 ml
- Tubos Eppendor 1,5 mL
- Pipeta Sorológica Estéril 10mL
- Pipetador acoplamento de pipetas 10ml
- Proveta graduada capacidade 100mL
- Becker graduado capacidade 50mL

Drogas, Soluções, Líquidos e Corantes

- Colchicina
- Meio RPMI 1640
- Fitohemaglutinina
- Soro Fetal Bovino
- Heparina Sódica 5000 u/i
- Ácido acético glacial 100%
- Metanol
- Giemsa eosina azul de metileno
- Solução tampão fosfato
- Solução KCL
- Tripsina em pó
- Álcool 70°

Outros

- Luvas descartáveis
- Algodão
- Gazes
- Garrote
- Blood stop

3.4.1.2 Método

Protocolo experimental

Foram coletadas de cada indivíduo 03ml de sangue periférico em seringa descartável com 0,2 mL de heparina sódica, sendo esse material imediatamente transportado, em caixa de isopor com gelo, para os Laboratórios do curso de Biomedicina, da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública – Salvador, campus III Cabula (Anexo C.5).

As culturas foram realizadas, por meio da adição de 18 gotas de sangue periférico em tubo de ensaio contendo 4,5 ml de meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 0,5 ml de soro fetal bovino, 0,1ml de fitohemaglutinina e mais ou menos 5 gotas de HCl para equilibrar o meio no pH 7,0 (HOLMQUIST, 1987). Após 70 horas de incubação numa estufa de CO₂ com temperatura de 37° C (MOOREHEAD *et al.* 1960), foram adicionados 0,1ml de Colchicina para cada meio, para impedir a citocinese das células em divisão, e posteriormente o material retornou para a estufa por 45 minutos (WATERS, 1995).

Na seqüência, esse material foi levado para a centrifuga por 5 minutos a uma rotação de 1000 rpm, onde foi descartado o sobrenadante, restando 1ml. Adicionou-se 4ml de KCl, agitando o material, deixando em banho maria por 12 minutos, visando expandir a membrana celular para liberação e melhor visualização cromossômica. A seguir foi adicionado 0,5ml de fixador (na proporção de 3:1 de metanol para ácido acético a 100%), posteriormente foi realizado uma nova centrifugação a 1000 rpm descartando o sobrenadante, permanecendo 1ml.

Foram realizadas sucessivas centrifugações com posterior remoções de sobrenadante, até a purificação e limpeza do material cromossômico (com 4 mL de fixador mais ou menos 3 vezes). Onde na terceira lavagem com o fixador o material foi para geladeira, em uma temperatura em torno de 7,5°C, por 1 hora (CONGER, 1953). Posteriormente há esse tempo o material foi resuspendido e levado para a centrifuga, retirou-se o sobrenadante, e procedeu-se o gotejamento sobre 3 lâminas.

As lâminas foram lavadas uma a uma em sabão neutro a 10% em água corrente e acondicionadas em recipiente contendo água destilada, a uma temperatura de 3° C. Com garantia de lâminas limpas e identificadas, pingou-se duas gotas do material sobre as lâminas geladas e molhadas. Com o auxílio de um papel absorvente retirou-se o excesso de água da parte inferior. Deixando-as secarem à temperatura ambiente Para a realização da coloração convencional, as lâminas foram coradas com solução Giemsa (Wright) e tampão fosfato(pH = 6,8) na proporção de 1:3 durante 4 minutos. Em seguida lavou-se com água destilada, sendo colocadas para secarem a temperatura ambiente (BACHS *et al.* 1992) (Figura 3).



Figura 3 – Sequência esquemática do Teste de Aberrações Cromossômicas em linfócitos de sangue periférico

3.4.1.3 Análise dos dados

As lâminas foram analisadas em teste cego. A análise foi realizada em metáfases bem espalhadas e sem sobreposição. Foram analisadas no mínimo 100 metáfases por indivíduo em microscópio óptico em objetiva de 100.

Para análise dos dados foram obtidas distribuições absolutas, percentuais e as medidas estatísticas: média, mediana, desvio padrão, coeficiente de variação e os valores máximo e mínimo das variáveis numéricas (Técnicas de estatística descritiva) e foram utilizados os testes estatísticos: t-Student com variâncias iguais ou desiguais, Qui-quadrado ou o teste Exato de Fisher quando as condições para utilização do teste Qui-quadrado não foram verificadas (Técnicas de estatística inferencial). Destaca-se que a verificação da hipótese de igualdade de variâncias foi realizada através do teste F de Levene. A digitação dos dados foi realizada na planilha Excel e a análise dos dados foi realizada através do programa (Statistical Package for the Social Sciences) na versão 13. Os testes estatísticos foram realizados utilizando-se a margem de erro de 5,0%.

3.4.2 Teste do micronúcleo em células esfoliadas de mucosa bucal

3.4. 2.1 Materiais

Aparelhos e Instrumentos Laboratoriais

- Cubas
- Caixas para guardar lâminas;
- Lâminas e lamínulas para microscopia;
- Proveta graduada capacidade 100mL
- Becker graduado capacidade 50mL
- Pipeta Sorológica Estéril 10mL
- Microscópio óptico binocular

Drogas, Soluções, Líquidos e Corantes

- Hipoclorito de Sódio
- Fast Green FCF
- Álcool metílico
- Ácido acético 100%
- Carvão ativo p.a
- Entellan p.a
- Ácido Clorídrico 37%
- Etanol Absoluto
- Escova cervical (citobrush)

Outros

- Luvas descartáveis
- Algodão
- Gazes
- Escova cervical (citobrush)

3.4.2.2 Método

3.4.2.2.1 Protocolo experimental

Os micronúcleos resultam de fragmentos acêntricos ou de cromossomos que se atrasam em relação aos demais em sua migração para os pólos da célula na anáfase, revelando assim a ação de agentes clastogênicos e aneugênicos (Rabello-Gay *et al.*, 1991). A frequência de micronúcleos representa um índice composto de aberrações cromossômicas em uma determinada população celular tendo sido proposta sua utilização como teste de curta duração para avaliação do potencial genotóxico de agentes químicos e físicos (Schmid, 1975). O Teste do Micronúcleo pode ser aplicado com sucesso a quaisquer células humanas esfoliadas que possam ser facilmente obtidas, como as do tecido da mucosa bucal. Os micronúcleos representam marcadores simples, que podem ser examinados em preparações citológicas de rotina, sendo considerado um teste valioso na avaliação de danos citogenéticos de populações ocupacionalmente expostas a agentes mutagênicos e carcinogênicos (Figura 4).

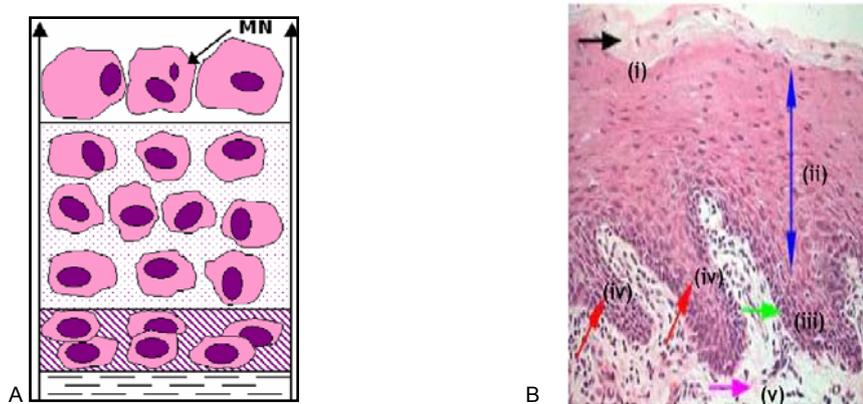


Figura 4 – Estrutura e diferenciação do epitélio oral. A - Desenho esquemático das camadas das células da mucosa bucal e sua renovação celular; B – fotomicrografia da mucosa oral mostrando as várias camadas de células (Figura adaptada de Holland et al. 2008).

As células da mucosa jugal quando agredida por agentes clastogênicos e aneugênicos, além de fragmentos de cromossomos podem apresentar outras alterações nucleares como picnose, cariólise, cariorréxis, broken-eggs e cromatina condensada, importantes para diagnóstico da injúria celular, otimizando a sensibilidade e especificidade do Teste do Micronúcleo. Essas anomalias podem estar correlacionadas com os genotóxicos em estudo e resultar de processos

biológicos distintos como genotoxicidade, que induzindo apoptose pode ser uma importante marca de resposta da iniciação de eventos cancerosos.

Obtenção e preparação do material

O material foi obtido mediante raspagem gentil da mucosa bucal, utilizando para tal a escova cytobrush (utilizada para coleta de células cervicais), com esse raspado foi confeccionado um esfregaço, com a auxílio de uma gota de solução de soro fisiológico (NaCl a 0,9%) previamente sobre a lâmina. Posteriormente as lâminas foram fixadas em solução metanol/ácido acético 3:1 e após 24 horas as preparações, assim obtidas, foram coradas de acordo com o método de Feulgen e Rossenbeck (1924), e contra-coradas com Fast Green a 1% em álcool absoluto por 1 minuto (Figuras 5, 6,7 e 8)

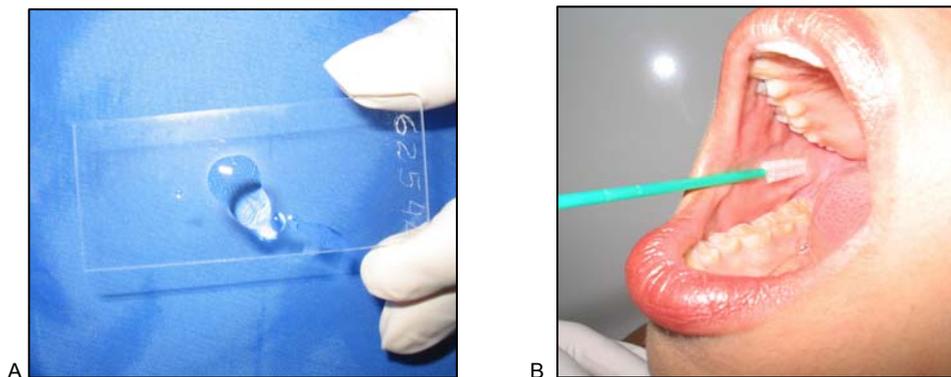


Figura 5 – A - Lâmina previamente identificada e com uma gota de soro fisiológico. B - Material coletado da mucosa bucal, utilizando escova cytobrush.

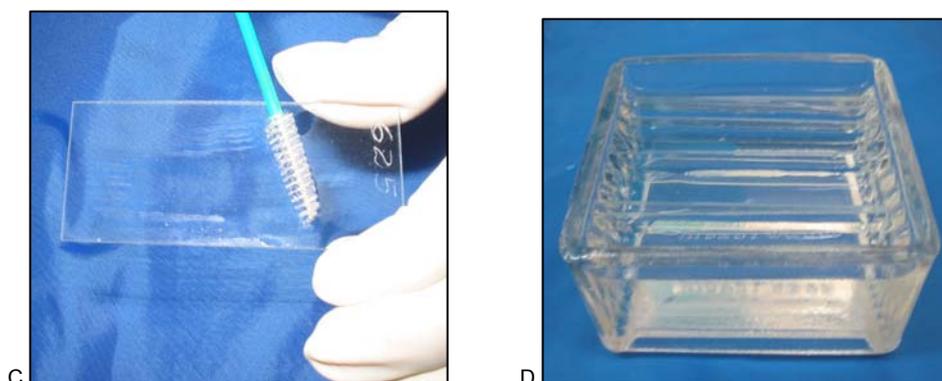


Figura 6 – C - Esfregaço do material coletado. D - Fixação do material em metanol/ ac. acético (3:1)

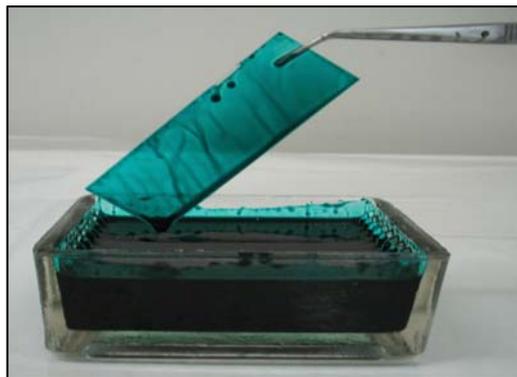


Figura 7 – Preparações contra coradas com Fast green à 1%.



Figura 8 - Lâmina corada e pronta para leitura

3.4.2.3 Análise do micronúcleo e das alterações nucleares

Toda a análise foi realizada em teste cego em relação ao questionário aplicado, e sob microscopia óptica. Os critérios de identificação do micronúcleo foram os descritos por Sarto *et al.* (1987) e por Tolbert *et al.* (1991,1992), foram considerados micronúcleos estruturas que apresentavam distribuição cromatínica e coloração igual (ou mais clara) do que a do núcleo, que estivessem no mesmo plano que este, apresentassem limites definidos e semelhantes ao núcleo e o seu tamanho não ultrapassar 1/3 do tamanho do núcleo. Foram computadas apenas células que apresentavam citoplasma íntegro. Além dos micronúcleos foi realizado a contagem das alterações nucleares degenerativas indicativas de apoptose e necrose: cariorréxis, cromatina condensada, picnose, cariólise e broken-egg (Figura 9).

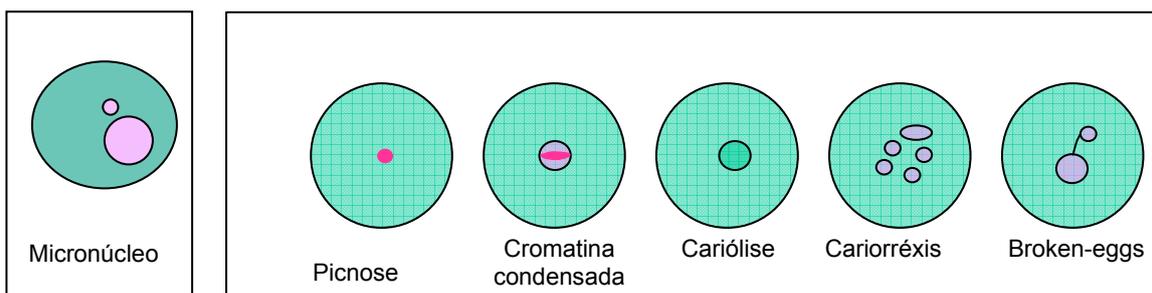


Figura 9 – Desenho esquemático de célula com micronúcleo e das alterações nucleares observadas em células da mucosa oral nas preparações do Teste do Micronúcleo (Adaptado de Tolbert et al. 1991,1992)

3.4.2.4 Destino das células coletadas

Após coleta das células da mucosa jugal, imediata confecção das lâminas e realização da leitura das mesmas, foram armazenadas em caixas apropriadas e guardadas nos armários do laboratório de Farmacologia da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, para futuras consultas se necessário (ficando esclarecido no TCLE a possibilidade do uso dessas lâminas para estudos futuros, respeitando os princípios éticos da pesquisa em humanos). Caso novo estudo seja realizado com essas lâminas, novo projeto será encaminhado ao Comitê de Ética em Pesquisa. Todas as lâminas armazenadas estão sob a responsabilidade da professora Maria Emilia S. P. Ramos e do técnico do laboratório de Farmacologia (Ciências Básicas I e II), campus Cabula, Salvador – Bahia, devidamente codificadas.

3.4.2.5 Análise estatística

A análise estatística relativa à ocorrência de micronúcleos e das alterações nucleares foi realizada pelo teste condicional para comparação de proporções em situações de eventos raros (Bragança-Pereira, 1991) que é um teste de significância alternativo ao Testes Qui-quadrado, na linha do teste Exata de Fischer (Kalbfleisch, 1979) e adequado à avaliação de eventos citogenéticos quando uma grande amostra de células é necessária para detecção da ocorrência de uma determinada

aberração cromossômica. Em todas as análises o nível de significância utilizado será de 5%.

3.4.3 – Teste Cometa em linfócitos de sangue periférico

3.4.3.1 Material

Aparelhos e Instrumentos Laboratoriais

- Cubas
- Caixas para guardar lâminas;
- Lâminas e lamínulas para microscopia;
- Tubo falcon 15 mL
- Tubo Eppendor - 1,5 mL
- Centrífuga (FANEM);
- Câmara umidificada;
- Estufa
- Geladeira e *freezer*;
- Garrote;
- Lâminas e lamínula;
- Microscópio de fluorescência
- Seringas descartáveis 10 mL e agulhas 25 x 7;

Drogas, Soluções, Líquidos e Corantes

- Água destilada;
- Álcool 90%;
- Agarose 1,5% (USO);
- Agarose 0,5% LMP;
- DMSO 5%;
- Etanol 100%;
- Gelo;
- Ficoll Hypaque
- PBS (Salina Fosfato Tamponada);
- Solução de EDTA;
- Solução de NaOH;

- Solução Tampão de Neutralização;
- Solução de Lise (USO);
- Solução de Eletroforese;
- Solução de Brometo de Etídio (GIBCO)

Outros

- Luvas descartáveis
- Gazes

3.4.3.2 Método

3.4.3.2.1 Protocolo experimental

A análise do cometa alcalino proposta por Singh *et al.* (1988), avalia a extensão da quebra do DNA nos linfócitos de sangue periférico, em indivíduos expostos a suspeitos agentes genotóxicos. O estudo do cometa está baseado na determinação da análise que leva em consideração a extensão do dano.

Isolamento e Manutenção dos Linfócitos

Os linfócitos foram isolados através de um gradiente de densidade. Uma amostra de 3mL de sangue periférico foi diluída em 5mL de PBS. Essa solução foi adicionada a um tubo Falcon contendo 2mL de ficoll e, posteriormente, centrifugada por 30 minutos a 1500 rpm. Após a centrifugação, a solução foi separada, em virtude da densidade do histopaque, em três camadas visíveis. Uma superior (soro), uma intermediária (linfócitos e histopaque) e uma inferior (hemácias). Em seguida, a região intermediária entre as hemácias e o soro, chamada “nuvem de linfócitos” foi aspirada e adicionada a um terceiro tubo contendo PBS, o qual foi centrifugado por 20 minutos a 1000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de linfócitos foi ressuspenso em 2mL de PBS. Os linfócitos foram utilizados imediatamente após o processo de isolamento (Figura 10A).

Preparação das lâminas

As lâminas foram previamente cobertas com agarose de ponto de fusão normal (0,5%) a uma temperatura de 60°C em solução de PBS livre de Ca^{2+} e Mg^{2+} , mantidos a temperatura ambiente até a solidificação da agarose de baixo ponto de fusão. Os linfócitos isolados foram embebidos em uma solução de agarose de baixo ponto de fusão (1,5%) a 37°C e adicionadas as lâminas pré-cobertas com agarose de ponto de fusão normal. Posteriormente, as lâminas foram cobertas com lamínulas para uniformizar a distribuição do material na lâmina e mantidas a 4°C para solidificação da agarose (Figura 10B).

Lise Celular

Após solidificação da agarose a lamínula foi delicadamente removida e as lâminas imersas na solução de lise (5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1% N-Lauroyl sarcosine; a pH 10,0; 1% Triton X 100; 10% DMSO), protegida da luz, em baixa temperatura (4°C) por num mínimo 1 h.

Neutralização e Eletroforese

As lâminas, foram removidos da solução de lise, e neutralizadas por 15 min. na solução de neutralização (0,4 M Tris, pH 7,5). As lâminas foram dispostas horizontalmente na cuba de eletroforese e preenchida com a solução de eletroforese a 4°C (1 mM Na_2 EDTA, 300 mM NaOH; pH > 13) até cobertura total. As lâminas repousaram por 20 mim para permitir o desenrolamento do DNA e a expressão do dano antes da eletroforese. A eletroforese foi conduzida a baixa temperatura inicialmente a 4°C por 20 min., usando 25 V e a corrente de 300 mA. Todos esses passos foram conduzidos na presença de ausência de luminosidade (a luz gera danos). Após eletroforese as lâminas, foram retiradas da cuba. E então mergulhadas numa solução tampão (0,4 M Tris, pH 7,5) durante 5 mim, para neutralizar a alcalinidade (Figura 10 C).

Após, corrida em eletroforese as lâminas foram fixadas com etanol a 100%. Posteriormente, foi aplicado 30 μ L da solução de Brometo de Etídio (20 μ g/mL) e em seguida foram cobertas com lamínula e mantidas a 4° C na geladeira.

3.4.3.3 Análise dos dados

As lâminas foram analisadas com o auxílio de microscópio de fluorescência. A análise foi realizada de acordo com o padrão de escores previamente determinados pelo tamanho e intensidade da cauda do cometa. Foram contados 100 cometas por lâmina (Lovell *et al.*, 1999) e classificados, por análise visual, dentre cinco categorias (0, 1, 2, 3 e 4) que representam a porcentagem de DNA na cauda do cometa, indicando o grau de lesão sofrido pela célula (Figura 11).

O índice de dano (ID) foi obtido pela seguinte fórmula: $ID = \sum_{i=0}^4 n_i \times i$, onde n_i é o número de células com nível de dano i (0, 1, 2, 3 ou 4). A frequência de dano (FD) representa a porcentagem de células que sofreram danos no DNA

Para verificação da ocorrência de diferença significativa entre os grupos pesquisados, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA), com nível de significância de 5% ($p < 0,05$); e pelo teste t, para $p < 0,0001$ no programa GraphPad Prism versão 5.0.

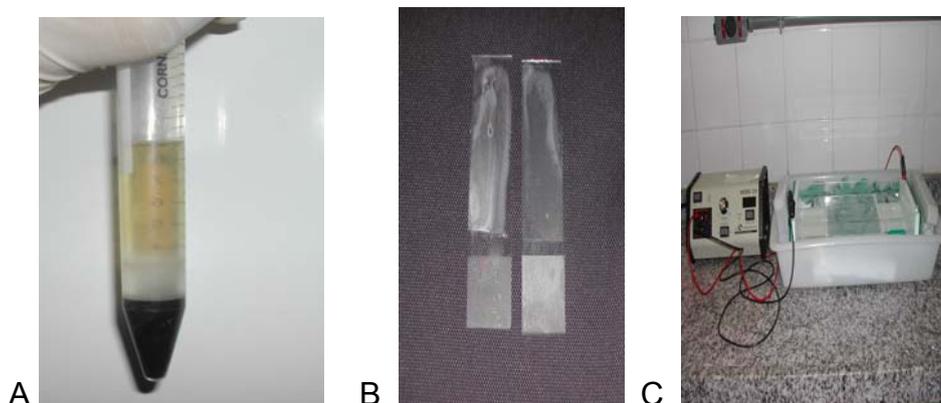


Figura 10 – Método Cometa : A – isolamento dos linfócitos; B – Preparação das lâminas em agarose; C – Após lise celular ocorre a Eletroforese

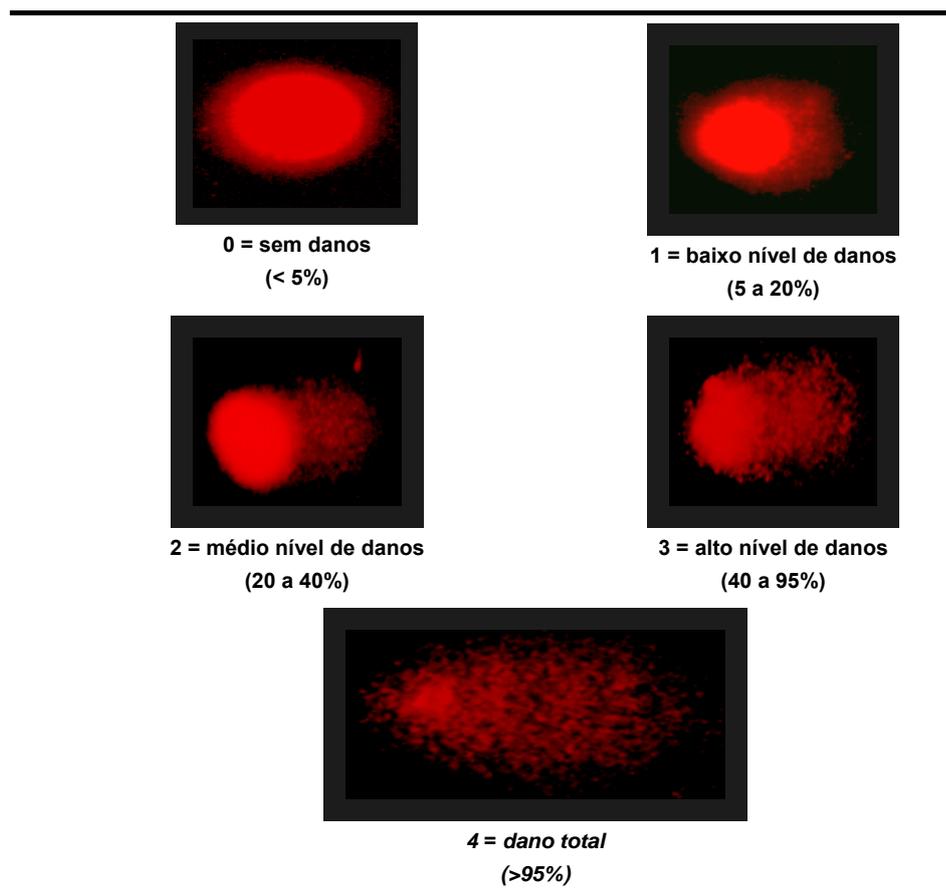


Figura 11 – Tipos de Cometa: representação dos cometas corados com brometo de edição. Sendo indicado o escore em que se atribui para cada cometa de acordo com o dano ao DNA.

3.5 Fish (Fluorescence in situ hybridization)

3.5.1 Método

Foi utilizada s sondas específicas para todos os centrômeros (ONCOR, P5095-B.5, Oncor Inc., E.U.A.). As lâminas foram preparadas pelo menos três dias antes, e tratada com 10% pepsina (Sigma) em HCl 10mM de 10 min a 37 ° C. As lâminas foram lavadas rapidamente em água destilada e tampão fosfato-salina (PBS) e pós-fixadas durante 10 minutos em temperatura ambiente com 1% formaldeído. Elas foram então lavadas com PBS e desidratados em 80% -90% -95% de etanol. Desnaturação do DNA foi realizada em 70% formamida (Sigma) em 2 × SSC (solução salina tampão citrato de sódio) a 70 ° C durante 2 min e desidratadas em série crescente de etanol concentração.

A mistura de hibridização contendo a sonda (2,5 g / ml) e 500 g / ml de DNA de esperma de salmão (Salmão testes de DNA, Sigma) na 2a-SSC, foi desnaturado , a 70°C por 5 min, seguido de resfriamento em gelo por 4 min. Uma alíquota de 50g foi aplicada para as lâminas, que foram depois cobertos com lamínulas e selado com cimento de borracha. Hibridização foi realizada durante 16 horas a 37°C em um câmara úmida.

Após a incubação, as lâminas foram lavadas duas vezes na 2a-CCD de 4 min e, em seguida em Tween-20 (Sigma buffer) por 5 min. As lâminas foram então incubadas com o reagente de bloqueio a 37° C por 10 min.

As lâminas foram lavadas com 4a-SSC, coberto com uma diluição de 1:250-anticorpo anti-biotina (Sigma) no IB (buffer imunológicos: 0,5% de leite desnatado na 4a-SSC) e incubado a 37° C por 30 min. Depois de uma lavagem em Tween-20, as lâminas foram incubados em uma diluição de 1:20-FITC-conjugado anticorpo anti-rato (Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemanha), seguido de incubação com uma 1:20-diluição do conjugado FITC anti-anticorpo de ovelha (Sigma) por 30 min a 37°C. Todas as incubações foram realizadas em uma câmara úmida, e foram seguidos por lavagens em Tween-20. Após a última lavagem, as lâminas foram desidratadas em série crescente de etanol, em seguida, corados com DAPI (5 g / ml, Sigma) em DABCO anti-fade solução (Sigma).

3.5.2 Análise de dados

Será aplicado o teste t Student's nas diferentes médias das frequências das células com micronúcleo nos grupos expostos e controle. Foram analisadas diferenças entre as médias e as porcentagens de C+MN e C-MN. Para nível de significância $p \leq 0,05$.

3.6 Avaliação Hematológica

3.6.1 Método

3.6.1.1 Protocolo experimental

Avaliação do Hemograma

Foi coletado de cada indivíduo 03ml de sangue periférico em seringa descartável, sendo posteriormente transferido esse volume a um tubo contendo EDTA e confeccionado um esfregaço com uma gota sobre uma lâmina. Após conclusão da coleta o material foi acondicionado em caixa de isopor com gelo, e imediatamente transportado para Laboratório de Análise Clínica da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, parceiro nessa pesquisa. A investigação hematológica foi processada em um aparelho de hematologia (contador automático de células), obtendo a contagem global de eritrócitos e o Volume Globular Médio (VGM), Concentração de Hemoglobina Globular Média (CHGM), Hemoglobina Globular Média (HGM), hematócrito e hemoglobina, e contagem global de leucócitos. Os esfregaços foram posteriormente corados pelo corante Wright por 3 minutos e em seguida acrescentado água destilada sobre o mesmo deixando por 10 minutos. Por fim o material foi analisado no microscópio para avaliar possíveis alterações morfológicas das células sanguíneas.

3.6.2 Análise dos dados

Foram considerados como valores normais para:

1- Hemograma:

- Eritrócitos Homens: $4,5 - 6,5 \times 10^6/\text{mm}^3$ e Mulheres $4,0 - 5,65 \times 10^6/\text{mm}^3$
- Hemoglobina: Homens: $13,5 - 18 \text{ g}/100\text{dl}$ e Mulheres: $12 - 16,5$

g/100dl

- Hematócrito: Homens: $40 - 54 \%$ e Mulheres: $35 - 47 \%$
- VGM: Homens $82 - 101$ e Mulheres $81 - 101$
- HGM: Homens $27 - 34\text{pg}$ e Mulheres $27 - 34\text{pg}$
- CHGM: Homens $31,5 - 36\%$ e Mulheres $31,5 - 36\%$

2- Leucograma: 5.000 a 10.000 mm^3

- Neutrófilos: 1800 a 8000mm^3
- Bastonetes: 0 a 200 mm^3 ;
- Linfócitos: 1500 a 5000 mm^3 .
- Monócitos: 90 a 900 mm^3 ;
- Eosinófilos: 50 a 500 mm^3 .

Para análise dos dados foram obtidas distribuições absolutas, percentuais e as medidas estatísticas: média, mediana, desvio padrão, coeficiente de variação e os valores máximo e mínimo das variáveis numéricas (Técnicas de estatística descritiva) e foram utilizados os testes estatísticos: t-Student com variâncias iguais ou desiguais, Qui-quadrado ou o teste Exato de Fisher quando as condições para utilização do teste Qui-quadrado não foram verificadas (Técnicas de estatística inferencial). Destaca-se que a verificação da hipótese de igualdade de variâncias foi realizada através do teste F de Levene.

A digitação dos dados foi realizada na planilha Excel e a análise dos dados foi realizada através do programa (Statistical Package for the Social Sciences) na versão 13. Os testes estatísticos foram realizados utilizando-se a margem de erro de 5,0%.

3.7 Avaliação Bioquímica: Hepática (ALT, AST e GGT)

Ferro e Ferritina

3.7.1 Método

Foi coletado de cada indivíduo 06ml de sangue periférico em seringa descartável, sendo posteriormente transferido esse volume para um tubo seco. Após conclusão da coleta o material foi acondicionado em caixa de isopor com gelo, e imediatamente transportado para Laboratório de Análise Clínica da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, parceiro nessa pesquisa. As dosagens de AST, ALT e GGT, ferro e de ferritina foram determinadas através de espectofotômetro.

3.7.2 Análise dos dados

As concentrações enzimáticas foram consideradas alteradas nos indivíduos com:

- AST (Transaminase-Glutamico-oxalacética) fora dos valores de 5,0 a 38,0U/L;
- ALT (Transaminase-Glutamico-pirúvica) fora dos valores de 10 a 40U/L;
- GGT (Gama-glutamilttransferase) fora dos valores para homens de 4,0 a 26,0U.I./L e de 4,0 a 22,0 U.I./L para mulheres.

- Ferro: 45 a 150 µg/dl

- Ferritina: Homens: 30-200 µg/L e Mulheres: 20-110 µg/L

Para análise dos dados foram obtidas distribuições absolutas e percentuais e as medidas as estatísticas: média, mediana, desvio e valor da correlação de Pearson (Técnicas de estatística descritiva) e foram utilizados os testes: Qui-quadrado de Pearson ou o Exato de Fisher quando as condições para utilização do teste Qui-quadrado não foram verificadas, teste t-Student com variâncias iguais e teste t-Student para a hipótese de que a correlação é nula (Técnicas de estatística inferencial). Ressalta-se que a verificação da hipótese de igualdade de variâncias foi realizada através do teste F de Levene.

O nível de significância utilizado na decisão dos testes estatísticos foi de 5,0%. Os dados foram digitados na planilha Excel e o “software” estatístico utilizado para a obtenção dos cálculos estatísticos foi o SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) na versão 13.

3.8 Parasitológico de Fezes

3. 8.1 Método

Foram distribuídos coletores descartáveis para todos os pesquisados, para a realização do parasitológico de fezes. Na data combinada recolhemos o material, que foi imediatamente encaminhado para o Laboratório de Análise Clínica da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública. Onde foi analisada a presença ou não de verminoses e quais parasitas presentes.

3.9 Aspectos éticos da pesquisa

Comitê de Ética em Pesquisa em Humanos

O projeto de pesquisa, com o protocolo experimental e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Bahiana para Desenvolvimento das Ciências.

O ensaio não foi iniciado antes que existisse um Protocolo escrito e aprovado pelo Comitê de Ética. O coordenador clínico foi responsável por obter aprovação do Protocolo de Estudo pelo Comitê de Ética, protocolo 43/2007 e 44/2007.

Condução do Estudo

O Estudo foi conduzido de acordo com a Declaração de Helsinque (1964) e as revisões de Tóquio (1975), Veneza (1983), Hong Kong (1989), Somerset Oeste (1996) e Edinburgo (2000), assim como as regulamentações locais (Resoluções 196/96 e 251/97 do CNS-MS).

Os investigadores foram responsáveis por conduzir o estudo em estrita observação ao Protocolo aprovado.

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Os voluntários receberam uma explanação da natureza e dos objetivos do estudo. Foi enfatizado que o estudo tem a finalidade de pesquisa, e que o voluntário não poderia esperar que houvesse qualquer efeito terapêutico. O voluntário também entendeu que ele é livre para não participar da pesquisa após este esclarecimento.

A participação dos voluntários nas atividades de recrutamento e seleção foi acompanhada de autorização prévia conforme o Termo de Recrutamento. Uma vez aprovada a participação do voluntário no estudo, foi solicitado a cada voluntário que, caso concorde, assinasse o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para participar no estudo, antes da admissão na pesquisa. Foi de responsabilidade do Coordenador Clínico (diretamente ou através de sua equipe) obter da assinatura do Termo de Consentimento.

Se, a juízo do Investigador Principal, uma emenda ao Protocolo tivesse alterado substancialmente o desenho do estudo ou o risco a que os voluntários foram submetidos, os voluntários seriam informados e deveriam assinar um novo consentimento relativo à decisão de continuar a participar no estudo.

Confidencialidade

Toda a informação obtida durante o estudo referente ao estado de saúde do voluntário foi disponível aos pesquisadores, cuja obrigatoriedade de manutenção do sigilo foi inerente a sua função.

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização da População estudada

Fizeram parte dessa pesquisa sessenta e três voluntários, de ambos os sexos, selecionados após aplicação dos critérios de inclusão e exclusão. Trinta e dois pertenciam ao grupo exposto a pesticidas e trinta e um indivíduos compuseram o grupo controle sem história de exposição a pesticidas.

4.1.1 Análise das médias de Idade entre os grupos estudados

Após aplicação do questionário foi verificado que a média de idade da amostra total foi de $X_{id}=28,30$; e, as obtidas nos Grupos Exposto e Controle foram, respectivamente, $X_{id}= 30,25$ e $X_{id}= 26,29$. A avaliação das diferenças entre os grupos, realizada com o uso do Teste Exato de Fisher não revelou diferenças entre as médias de idade. A tabela I, apresenta a distribuição por média de idade no Grupo Exposto e Controle.

Tabela1 – Estatística das médias de idades dos indivíduos

Estatística	Grupo		Grupo Total (n = 63)	Valor de p
	Exposto (n = 32)	Controle (n = 31)		
Média	30,25	26,29	28,30	$p^{(1)} = 0,085$
Mediana	28,00	22,00	25,00	
Desvio padrão	9,18	8,60	9,12	
Coeficiente de Variação	30,35	32,71	32,23	
Mínimo	18	19	18	
Máximo	52	58	58	

(*): Diferença significativa entre os grupos.

(1): Através do teste Exato de Fisher.

4.1.2 Prevalência do gênero estudado

Na Tabela 2 podemos observar a distribuição do sexo dos indivíduos de acordo com a disposição dos grupos. O grupo exposto foi constituído por 22 homens e 10 mulheres representando 68,7% e 31,3% respectivamente; o grupo controle foi formado por 10 homens e 21 mulheres representando 32,7% e 67,3% respectivamente. A avaliação da diferença na proporção de homens e mulheres entre os grupos, feita com o uso do Teste de Qui-quadrado, revelou diferença significativa ($p < 0,05$). Nessa avaliação podemos observar que o percentual de indivíduos do sexo masculino foi mais elevado no grupo exposto do que no grupo controle (68,7% x 32,3%), diferença esta que revela significância entre os grupos para o nível de significância considerado .

Tabela 2 - Distribuição dos sexos dos indivíduos separados por grupo.

Variável	Grupo						Valor de p
	Exposto		Controle		Grupo Total		
	n	%	n	%	N	%	
• Masculino	22	68,7	10	32,3	32	50,8	$p^{(1)} = 0,004^*$
• Feminino	10	31,3	21	67,7	31	49,2	
TOTAL	32	100,0	31	100,0	63	100,0	

(*): Diferença significativa a 5,0%.

(1): Através do teste Qui-quadrado de Pearson.

4.1.3 Determinação Escolaridade

O grau de escolaridade foi categorizado por anos de estudo, a maioria dos indivíduos do grupo exposto apresentava baixo nível escolar (igual ou menos do que quatro anos de estudo) representando 81,2% desse grupo, enquanto que no grupo controle não foi encontrado indivíduos nessa categoria. Na faixa de mais de quatro anos até oito anos que representa o primeiro grau, no grupo exposto observamos

apenas 12,5% em detrimento dos 22,6% do grupo controle. E na faixa que corresponde ao segundo grau (mais de oito anos de estudo) identificamos 6,3% de indivíduos no grupo exposto em oposição a 77,4% do grupo controle.

Tabela 3 – Avaliação dos anos de escolaridade distribuídos nos grupos

Escolaridade	Grupo				Valor qui-quadrado e graus de liberdade	Valor de p ⁽¹⁾
	Exposto (n = 32)		Controle (n = 31)			
	n	%	n			
≤ 4 anos	26	81,2	-	-	$\chi^2 = 45,429$	< 0,001*
> 4 anos e ≤ 8 anos	4	12,5	7	22,6	GL = 2	
> 8 anos e ≤ 11 ou mais	2	6,3	24	77,4		
TOTAL	32	100,0	31	100,0		

(*): Diferença significativa a 5,0%.

(1): Através do teste Qui-quadrado de Pearson.

4.1.4 Tempo de trabalho na lavoura (Grupo Exposto)

O tempo de trabalho na lavoura, que representa tempo de exposição aos pesticidas, variou de 1 a 40 anos (Quadro 4), com média de 13,5 anos utilizando pesticidas, desvio padrão de 10 anos e coeficiente de variação de 74,83%. A mediana do tempo de exposição foi 12,50% anos.

Quadro 4 – Avaliação do tempo de exposição no grupo exposto a pesticida

Tempo de exposição (anos)	N de indivíduos	%
1 a 5	10	31,3
6 a 10	5	15,6
11 a 15	5	15,6
16 a 20	7	21,9
21 a 40	5	15,6
TOTAL	32	100,0

4.1.5 Uso de Equipamento de Proteção Individual (EPI)

Dos 32 indivíduos pesquisados do grupo exposto a pesticidas, 14 (43,7%) relataram, durante a aplicação do questionário, utilizarem Equipamentos de Proteção Individual (EPI) (luvas, máscara e bota) no momento da aplicação do produto e 18 (56,7%) referiram não utilizar nenhum equipamento de proteção até o momento (Gráfico 1).

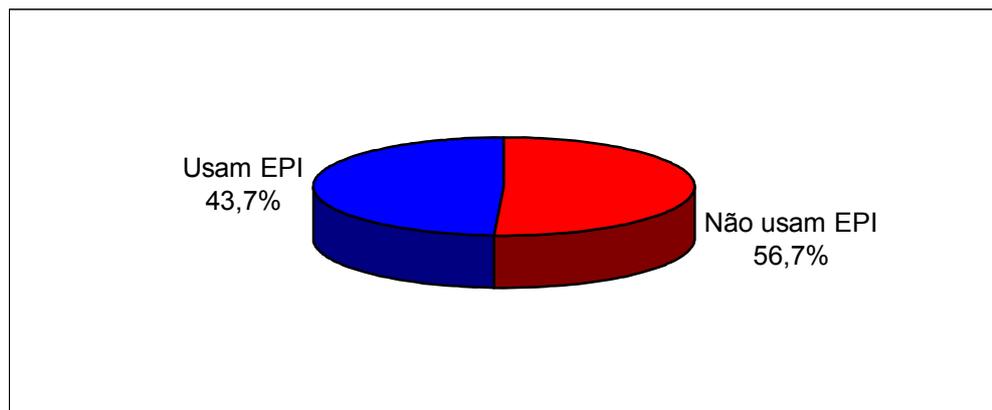


Gráfico 1 – Distribuição dos pesquisados do grupo exposto decorrente do uso ou não uso de EPI

4.1.6 Sintomas após aplicação do pesticida

A presença de sintomas de intoxicação após a aplicação imediata do pesticida foi registrada em 6 (18,8%) dos 32 indivíduos do grupo exposto e a ausência de qualquer sintoma em 26 (81,2%) dos entrevistados (Gráfico 2). Todos os 18,8% dos indivíduos entrevistados, que apresentavam sintomas pós aplicação do pesticida, relataram sentir somente cefaléia (dor de cabeça).



Gráfico 2 – Distribuição dos indivíduos analisados segundo a ocorrência de sintomas após aplicação imediata do pesticida

4.2 Avaliação da atividade genotóxica e citotóxica

4.2.1 Ocorrência de Aberrações Cromossômicas

A avaliação da ocorrência de Aberrações Cromossômicas (AC) foi contabilizada através das alterações numéricas encontradas em 100 metáfases analisadas, por duas lâminas/indivíduo. Foi verificado que no grupo dos indivíduos expostos a pesticidas ocorreram aberrações cromossômicas em 43,7% dos indivíduos, ocorrência não observado nos indivíduos do grupo controle, diferença significativa entre os dois grupos ($p < 0,001$) (tabela 4).

Tabela 4 – Avaliação da ocorrência de alterações cromossômicas numéricas nos indivíduos expostos e não expostos aos pesticidas

Aberrações cromossômicas	Grupo						Valor de p
	Exposto		Controle		Grupo Total		
	N	%	N	%	N	%	
Sim	14	43,7	-	-	14	22,2	$p^{(1)} < 0,001^*$
Não	18	56,3	31	100,0	49	77,8	
TOTAL	32	100,0	31	100,0	63	100,0	

(*): Diferença significativa entre os grupos.

(1): Através do teste Qui-quadrado de Pearson.

Após análise das 3200 metáfases do grupo exposto a pesticidas identificamos 105 células com alterações cromossômicas numéricas, representando 3,3% . Essas alterações cromossômicas não foram encontradas em nenhuma das 3100 células analisadas do grupo controle. De acordo com a análise estatística, esses valores mostram-se significativamente diferentes entre os grupos pesquisados (Tabela 5).

Tabela 5 – Frequência de células com alterações cromossômicas numéricas de acordo com os indivíduos expostos e não exposto a pesticidas.

Células com alteração cromossômica	Grupo				Valor qui-quadrado e graus de liberdade	Valor de p ⁽¹⁾
	Exposto (n = 32)		Controle (n = 31)			
	N	%	N	%		
Sim	105	3,3	-	-	$\chi^2 = 103,44$	0,001*
Não	3095	96,7	3100	100,0	gl = 1	
TOTAL	3200	100,0	3100	100,0		

(1): Através do teste Qui-quadrado de Pearson.

A quantidade de aberrações cromossômicas numéricas encontradas nessa avaliação, foi categorizada em intervalos. Foi observado que a maior frequência de alterações encontra-se na faixa de 6 a 10 aberrações, correspondendo a 21,9% dos indivíduos exposto aos pesticidas. E que 56,3% dos indivíduos desse grupo não apresentaram nenhuma alteração a nível numérico. Além disso, 12,5% e 9,4% respectivamente apresentavam alterações na faixa de 3 a 5 e >10 aberrações numéricas por indivíduo (Tabela 6).

Tabela 6 – Distribuição dos indivíduos segundo o número de alterações no grupo exposto

Quantidade de aberrações (alterações numéricas))	n	%
Nenhuma	18	56,3
3 a 5	4	12,5
6 a 10	7	21,9
> 10	3	9,4
TOTAL	32	100,0

n= indivíduos expostos

4.2.2 Ocorrência de Micronúcleo

Um total de 65.521 células foram analisadas nesse experimento. A avaliação da ocorrência de micronúcleos para o grupo exposto foi realizada em 33.323 células, presentes em 32 lâminas (preparações). E para o grupo controle foram analisadas 32.198 células em 31 lâminas. Foram observados 44 micronúcleos nas 65.521 células analisadas do material coletado em ambos os grupos, sendo

distribuídos em 27 micronúcleos no grupo exposto e 17 micronúcleos encontrados no grupo controle. As diferenças na ocorrência de micronúcleos entre os grupos foram avaliadas através do Teste de Qui-quadrado, onde não foram encontradas diferenças entre os grupos pesquisados (Tabela 7) (Figura 12 A).

Tabela 7 - Dados referentes à ocorrência de MN entre os Grupos Exposto e Controle

Micronúcleo			
Grupo	MN Observado	MN Esperado	Total de Células
Controle	17	21,622259	32198
Exposto	27	22,377741	33323
TOTAL	44	44,0000	65521
$\chi^2 =$	1,9429	$p = 0,163$	GL = 1

4.2.2.1 Ocorrência de Alterações Nucleares

Nessa avaliação foram observadas as ocorrências de alterações nucleares descritas como Cromatina Condensada, Cariólise, Cariorrexix, Broken-egg e Picnose decorrente da lesão ao DNA (Figura 1 B, C, D, E e F). Dentro dessas alterações foram observadas diferenças estatisticamente significante nas avaliações de Cromatina Condensada, onde foram encontradas 1016 células com cromatina condensada das 33.323 analisadas do grupo exposto e 729 células das 32.198 do grupo controle (Tabela 8); Cariorrexix foi observada em 211 células das 33.323 do grupo exposto e 322 células das 32.198 de grupo controle (Tabela 9) e Cariólise foi identificada em 01 célula das 33.323 do grupo exposto e 07 células das 32.198 do grupo controle (Tabela 10). E 14 Broken-eggs foram encontrados em 33.323 células analisadas no grupo exposto, enquanto que 3 Broken-eggs nas 32.198 células do grupo controle (Tabela 12) (Figura 12) B, C, E, F). As diferenças na ocorrência de alterações nucleares entre os grupos foram avaliadas através do Teste de Qui-quadrado.

E não houve diferença significativa nas avaliações de Picnose (Tabela 11) e Broken-egg (tabela12).

Tabela 8 - Dados referentes à ocorrência de Cromatina Condensada entre os Grupos Exposto e Controle

Cromatina Condensada			
Grupo	CC Observado	CC Esperado	Total de Células
Controle	729	857,519116	32198
Exposto	1016	887,480884	33323
TOTAL	1745	1745,0000	65521
$X^2 = 38,909$		$p < 0,001^*$	GL = 1

Tabela 9 - Dados referentes à ocorrência de Cariorréxis entre os Grupos Exposto e Controle

Cariorréxis (CR)			
Grupo	CR Observado	Esperado	Total de Células
Controle	322	261,9242	32198
Exposto	211	271,0758	33323
TOTAL	533	533,0000	65521
$X^2 = 27,315$		$p < 0,001^*$	GL = 1

Tabela 10 - Dados referentes à ocorrência de Cariólise entre os Grupos Exposto e Controle

Cariólise			
	Observado	Esperado	Total de Células
Controle	7	3,93131973	32198
Exposto	1	4,06868027	33323
TOTAL	8	8	65521
$X^2 = 4,709787799$		$p = 0,030^*$	GL = 1

Tabela 11 - Dados referentes à ocorrência de Picnose entre os Grupos Exposto e Controle

Picnose (PN)			
Grupo	PN Observado	PN Esperado	Total de Células
Controle	31	30,4677279	32198
Exposto	31	31,5322721	33323
TOTAL	62	62	65521
$X^2 = 0,018283686$		$p = 0,892$	GL = 1

Tabela 12 - Dados referentes à ocorrência de Broken-eggs entre os Grupos Exposto e Controle

Broken-eggs (BE)			
Grupo	BE Observado	BE Esperado	Total de Células
Controle	3	8,354054425	32198
Exposto	14	8,645945575	33323
TOTAL	17	17	65521
$X^2 = 6,746906426$		$p = 0,009^*$	GL = 1

O somatório das ocorrências de cromatina condensada, cariólise, picnose e cariorréxis, indicam células em estágio de necrose, ou seja morte celular conseqüente a ação de agente potencialmente citotóxico. Podemos comprovar esse evento (necrose) nos indivíduos expostos a pesticidas quando identificamos uma diferença significativa quando comparado com o grupo controle (Tabela 13).

Tabela 13 - Dados referentes à ocorrência de Necrose entre os Grupos Exposto e Controle

Necrose			
	Observado	Esperado	Total de Células
Controle	1066	1142,539796	32198
Exposto	1259	1182,460204	33323
TOTAL	2325	2325	65521

$\chi^2 = 10,453$	$p = 0,001^*$	GL = 1
-------------------	---------------	--------

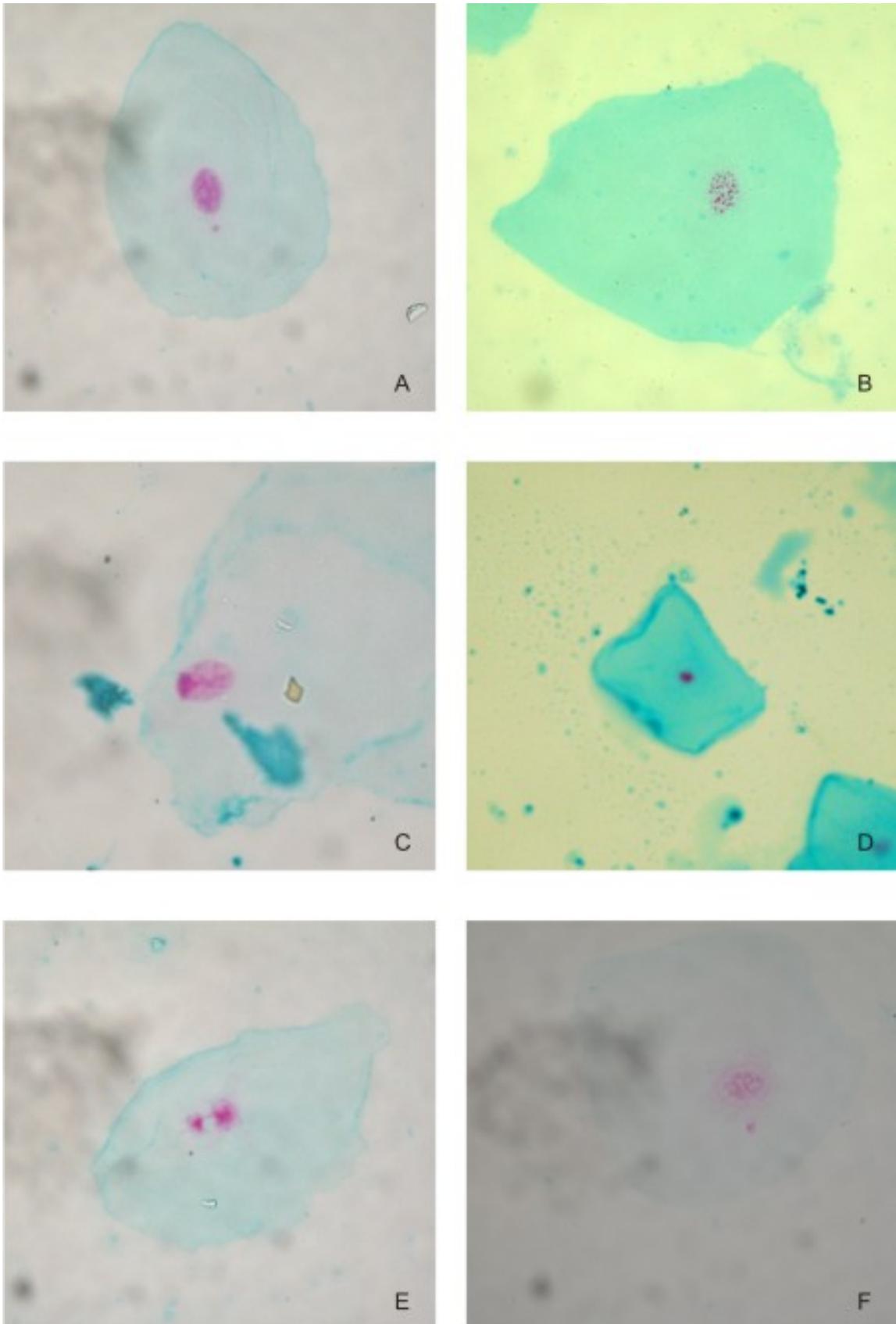
A avaliação da ocorrência de alterações indicativas de apoptose foi realizada considerando o somatório de cariorréxis, cromatina condensada e picnose. A presença dessas alterações em freqüências elevadas é indicativa de genotoxicidade e está relacionada à iniciação do processo de transformação maligna (Tabela 14).

Tabela 14 - Dados referentes à ocorrência de Apoptose entre os Grupos Exposto e Controle

Apoptose			
	Observado	Esperado	Total de Células
Controle	1059	1138,608477	32198
Exposto	1258	1178,391523	33323
TOTAL	2317	2317,0000	65521

$\chi^2 = 11,345$	$p = 0,001^*$	GL = 1
-------------------	---------------	--------

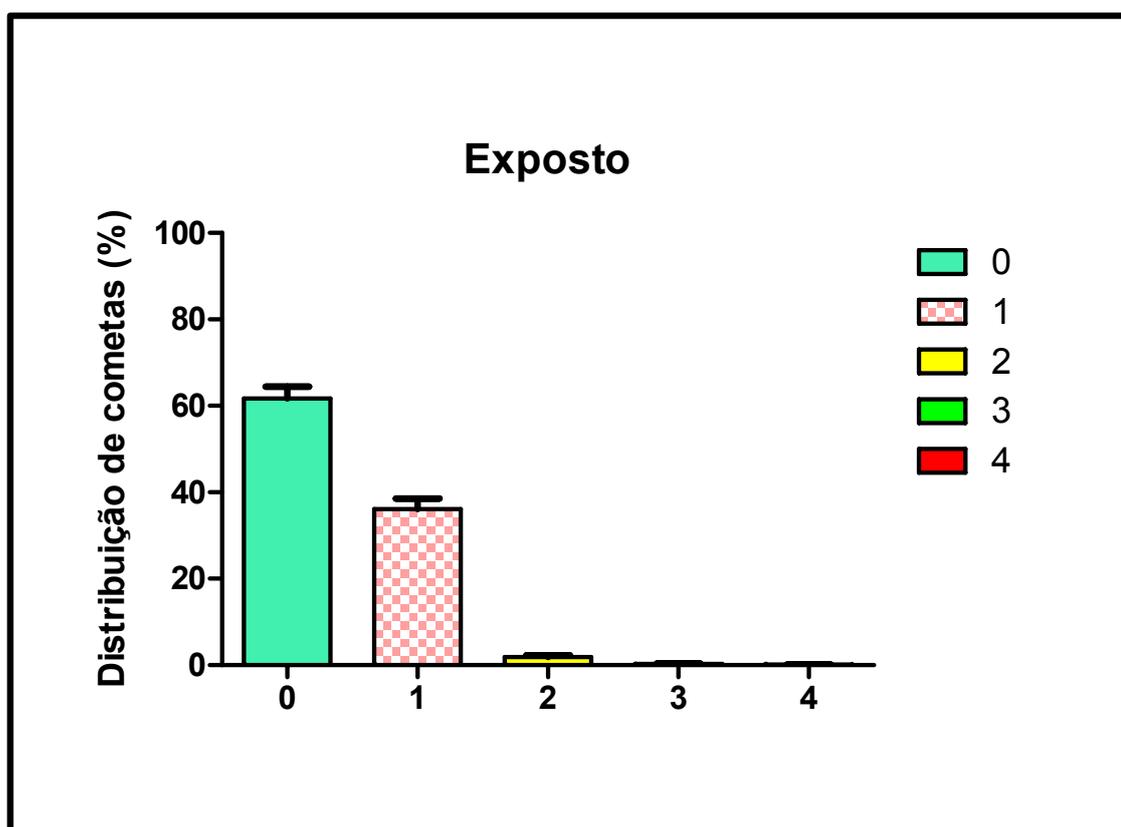
Figura 12 – Fotografia de células esfoliadas de mucosa bucal: micronucleada (A), cariorréxis (B), cromatina condensada (C), picnose (D), broken-egg (E) e cariólise (D).



4.2.3 Ocorrência de cometas

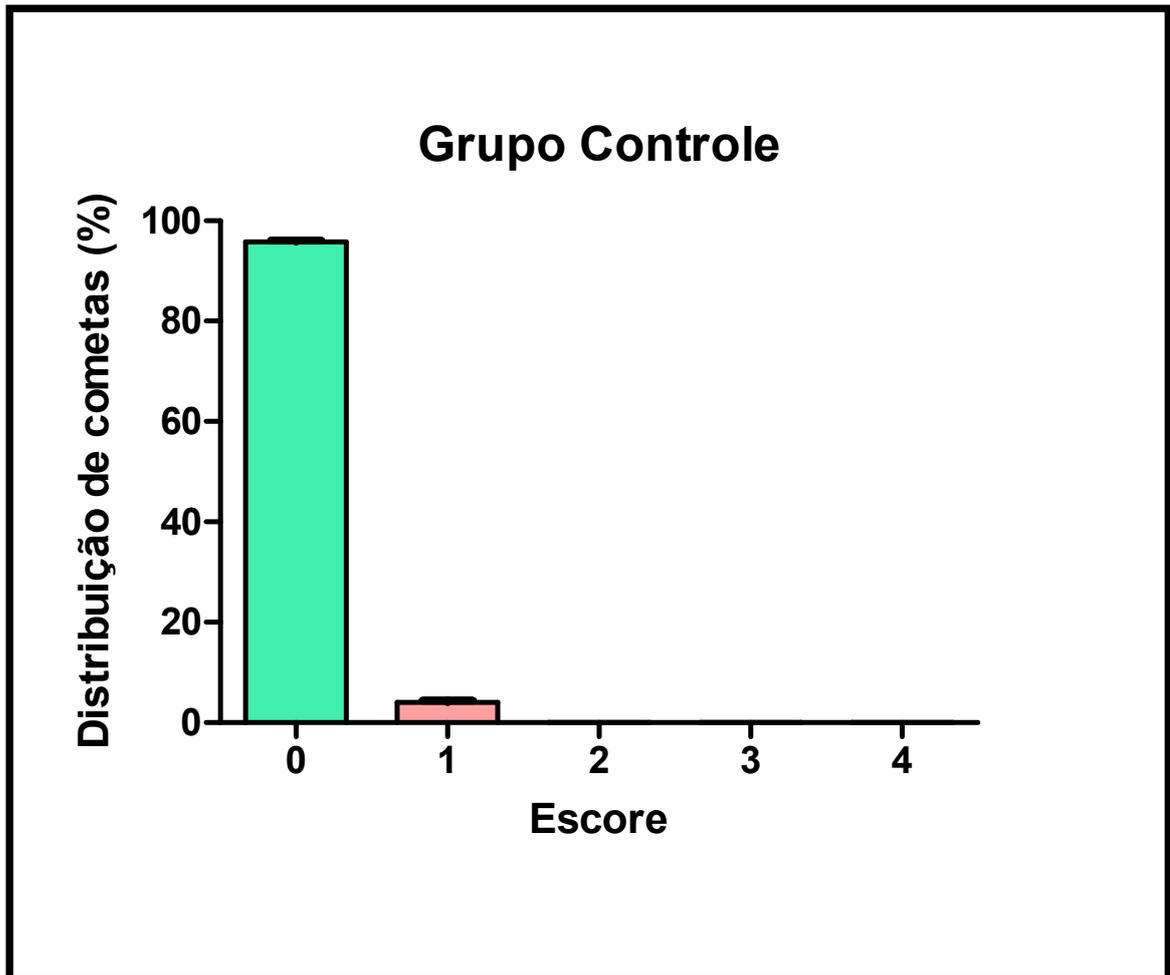
Para verificar a ocorrência de cometas um total de 12.600 células foram analisadas, a partir do sangue periférico coletado dos indivíduos pesquisados, neste estudo. Foram contabilizadas 200 células (100 células/lâmina) por indivíduo. Das 6.400 células analisadas no grupo exposto a pesticidas observamos a presença de danos ao DNA a nível dos escores 2, 3 e 4 e maior frequência no escore 1, assim como frequência no escore 0 (sem dano ao DNA)(Gráfico 3).

Gráfico 3 - Ocorrência de cometas segundo o dano ao DNA (escore 0, 1, 2, 3 e 4) no grupo exposto a pesticida



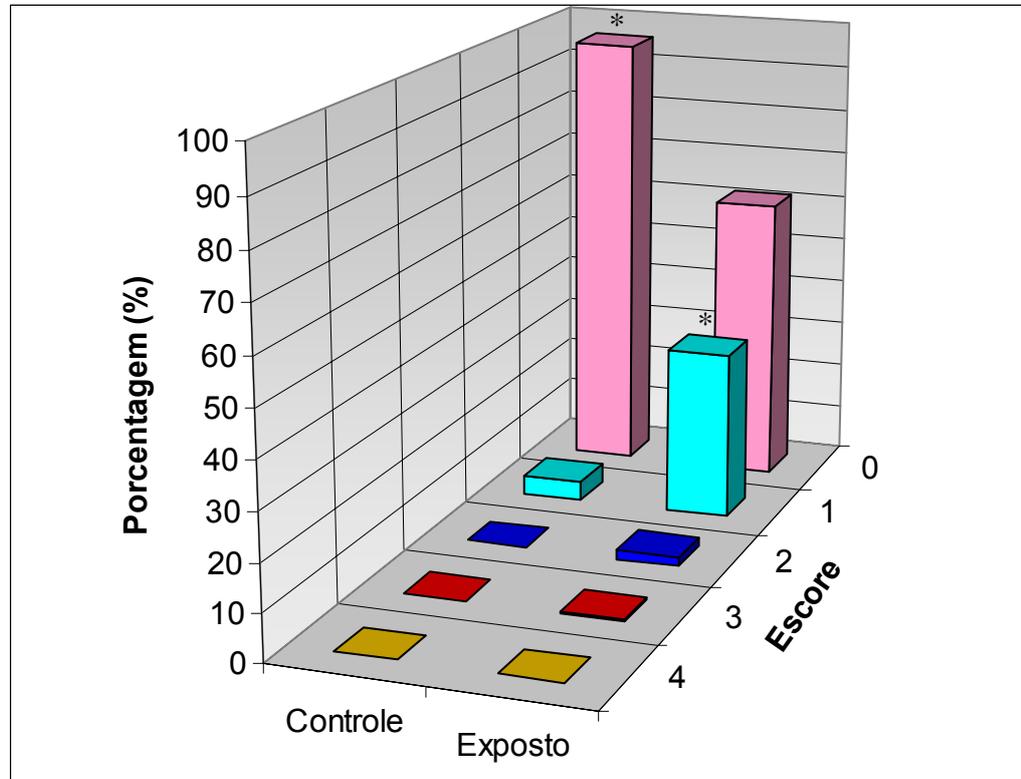
Observando a frequência de cometas nas 200 células analisadas do grupo controle, diferentemente do grupo exposto não encontramos células com escore 2, 3 e 4 e uma baixa frequência no dano 1. Com maior concentração de frequência no escore que representa ausência de dano (escore 0) (Gráfico4)

Gráfico 4 - Ocorrência de cometas segundo o dano ao DNA (escore 0, 1, 2, 3 e 4) no grupo não exposto a pesticida



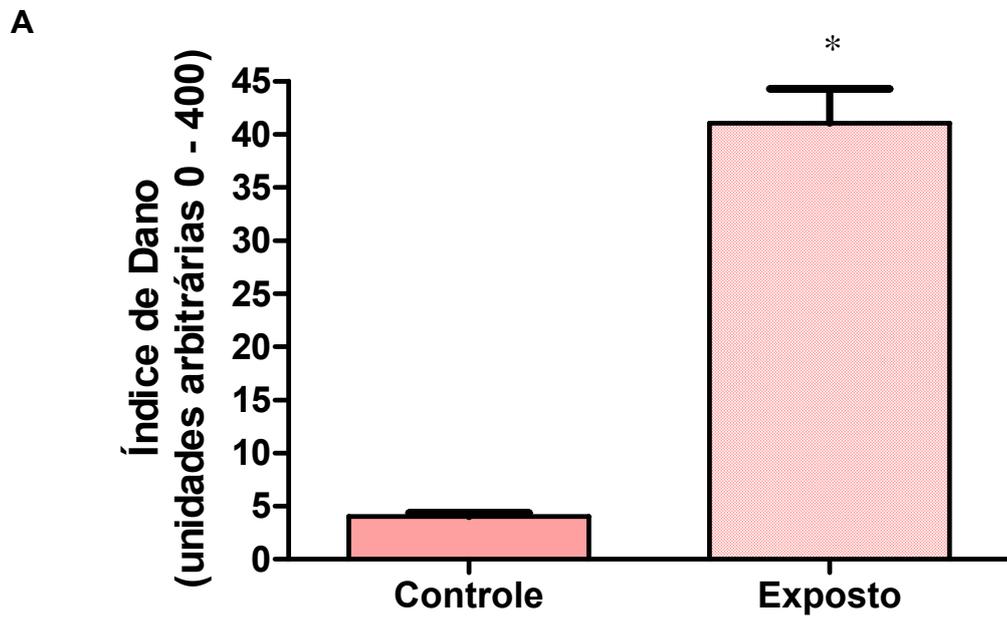
Quando comparado os cometas, segundo os escores 0, 1, 2, 3 e 4, encontrados em ambos os grupos, identificamos uma diferença significativa no escore 1 (dano reparável) no grupo exposto em relação ao grupo controle ($p < 0.001$), e essa mesma diferença no escore 0 (ausência de dano) para o grupo controle, quando comparado ao grupo exposto ($p < 0.001$). E não foram encontradas diferença significativa entre os grupos nos escores 2, 3 e 4 (Gráfico 5) (ANOVA).

Gráfico 5 – Distribuição das células analisadas através do teste cometa segundo ocorrência de dano ao DNA (escore 0, 1, 2, 3 e 4) entre o grupo exposto e não exposto a pesticida



(*): Diferença significativa entre os grupos. ($p < 0,001$)
Através do teste ANOVA

No grupo exposto a pesticidas a indução de dano ao DNA foi significativa em relação ao grupo controle. O grupo exposto apresentou um aumento no índice de dano (ID) de 9 a 10 vezes maior em relação ao grupo controle. Foi observado elevação na frequência de dano onde o grupo exposto expôs um aumento de 8 a 9 vezes maior do que o grupo controle. Esses achados identificam o potencial genotóxico nos linfócitos dos indivíduos pesquisados quando comparados aos indivíduos do grupo controle ($p < 0,0001$) (Figura 13).



B

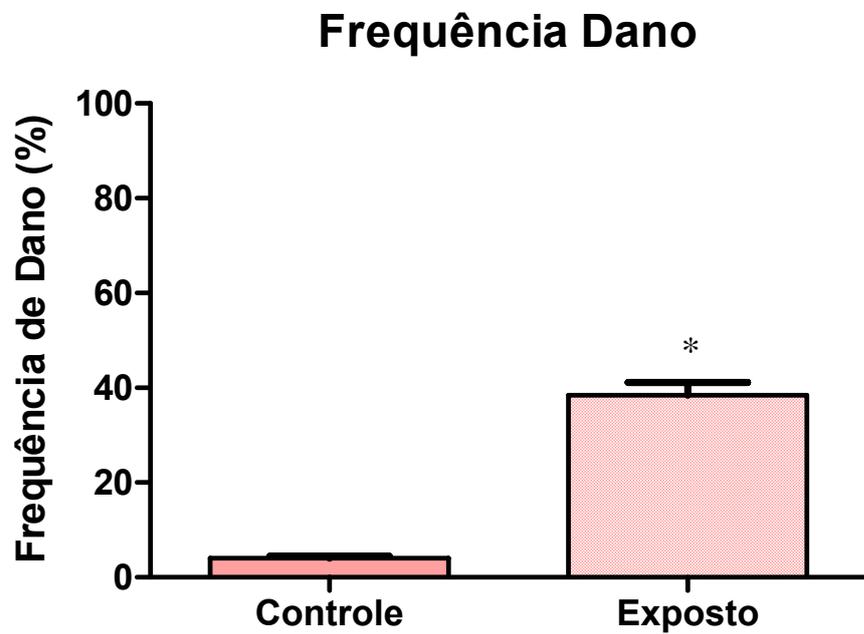


Figura 13: Painel A - Índice de Dano: média ± SEM 4.032 ± 0.3336 para o grupo controle e média ± SEM 41.05 ± 3.227 para o grupo exposto a pesticida (* $p < 0,0001$ vs. controle). Painel B - Frequência de Dano: média ± SEM grupo controle 4.081 ± 0.3667 e média ± SEM grupo exposto a pesticida 38.44 ± 2.664 (* $p < 0,0001$ vs. controle). (teste t)

4. 3 Avaliação das Variáveis Hematológicas

4.3.1 Série Vermelha

Examinando os resultados obtidos das variáveis hematológicas pós coleta de sangue periférico, categorizando os valores encontrados em normal, abaixo e acima, destaca-se que não se verificam diferenças percentuais em relação a quantidade de hemácias (abaixo e acima do normal) entre os dois grupos. Analisando o percentual de indivíduos com hemoglobina com taxas abaixo do padrão de normalidade identificou-se ser bem mais elevado entre os indivíduos do grupo exposto do que no grupo controle (68,8% x 29,0%) apresentando diferença significativa ($p= 0,001$) e o contrário ocorreu entre os indivíduos com taxas de hemoglobina normal, que apresentou um percentual mais elevado no grupo controle do que no grupo exposto (71,0% x 25,0%). Com relação ao hematócrito com exceção de um indivíduo do grupo teste que apresentou hematócrito elevado e de dois do grupo controle que apresentaram o hematócrito abaixo do padrão de normalidade, todos os demais se encontravam dentro dos padrões considerados normais, sem diferenças significantes. Analisando o VGM (Volume Globular Médio) indicativo de alterações no tamanho da hemácia, apenas um único indivíduo do grupo controle apresentou VGM abaixo do limite de referência e os demais se encontravam dentro dos valores normais, não apresentando desse modo diferenças significantes entre os grupos exposto e controle. O percentual de indivíduos com HGM (Hemoglobina Globular Média) abaixo dos valores de referência foi encontrado em 34,4% dos indivíduos do grupo exposto e essa variável não se encontrou alterada em nenhum indivíduo do grupo controle (0,00%), apresentando diferença estatisticamente significativa entre os grupos pesquisados. E o percentual de indivíduos com CHGM (Concentração Hemoglobina Globular Média) abaixo do limite referência foi bem mais elevado no grupo dos indivíduos expostos a pesticidas do que no grupo controle (59,4% x 6,5%) demonstrando diferenças significantes entre os grupos.(Tabela 15)

Nos parâmetros Hemoglobina, HGM e CHGM que estão relacionados a investigação de anemias, observamos diferenças significantes entre os grupos pesquisados ($p < 0,05$) e indicativo de anemia para o grupo exposto a pesticida.

Tabela 15 – Avaliação das variáveis: hemácias, hemoglobina, hematócrito, VGM, HGM e CHGM segundo resultado abaixo, normal e acima do preconizado.

Variável	Grupo				Grupo Total		Valor de p
	exposto		Controle		n	%	
	N	%	n	%	n	%	
Hemácias							
Abaixo	13	40,6	12	38,7	25	39,7	p(1) = 1,000
Normal	17	53,1	18	58,1	35	55,6	
Acima	2	6,3	1	3,2	3	4,8	
Hemoglobina							
Abaixo	22	68,8	9	29,0	31	49,2	p(1) = 0,001*
Normal	8	25,0	22	71,0	30	47,6	
Acima	2	6,3	-	-	2	3,2	
Hematócrito							
Abaixo	-	-	3	9,7	3	4,8	p(1) = 0,174
Normal	31	96,9	28	90,3	59	93,7	
Acima	1	3,1	-	-	1	1,6	
VGM							
Abaixo	-	-	1	3,2	1	1,6	p(1) = 0,492
Normal	32	100,0	30	96,8	62	98,4	
Acima	-	-	-	-	-	-	
HGM							
Abaixo	11	34,4	-	-	11	17,5	p(2) < 0,001*
Normal	21	65,6	31	100,0	52	82,5	
Acima	-	-	-	-	-	-	
CHGM							
Abaixo	19	59,4	2	6,5	21	33,3	p(1) < 0,001*
Normal	13	40,6	28	90,3	41	65,1	
Acima	-	-	1	3,2	1	1,6	
TOTAL	32	100,0	31	100,0	63	100,0	

(*): Diferença significativa a 5,0%.

(1): Através do teste exato de Fisher.

(2): Através do teste Qui-quadrado de Pearson

Considerando os valores obtidos e tomando, agora como referência a média e mediana das variáveis hematológicas, observamos que com exceção da variável VGM (Volume Globular Medis) onde não se encontrou diferenças entre os grupos,

existe diferença significativa nas variáveis Hemácias, Hemoglobina, Hematócrito, HGM (Hemoglobina Globular Média), CHGM (Concentração Hemoglobina Globular Média) entre o grupo exposto a pesticida e o grupo controle (ao nível de 5,0%) confirmando a anemia no grupo exposto (Tabela 16).

Tabela 16 – Estatística das variáveis: hemácias, hemoglobina, hematócrito, VGM, HGM e CHGM segundo o grupo pesquisado

Variável	Estatística	Grupo			Valor de p
		Teste (n = 32)	Controle (n = 31)	Grupo Total (n = 63)	
Hemácias	Média	4,916	4,506	4,714	p(1) < 0,001*
	Mediana	4,850	4,500	4,700	
	Desvio padrão	0,385	0,492	0,484	
	Coeficiente de Variação	7,831	10,918	10,267	
	Mínimo	4,400	4,000	4,000	
	Máximo	6,100	5,800	6,100	
Hemoglobina	Média	13,569	12,619	13,102	p(1) = 0,004*
	Mediana	13,400	12,100	13,100	
	Desvio padrão	1,156	1,344	1,331	
	Coeficiente de Variação	8,519	10,650	10,158	
	Mínimo	11,800	10,600	10,600	
	Máximo	18,000	15,600	18,000	
Hematócrito	Média	44,156	38,677	41,460	p(2) < 0,001*
	Mediana	44,000	37,000	42,000	
	Desvio padrão	3,456	4,607	4,885	
	Coeficiente de Variação	7,826	11,911	11,782	
	Mínimo	40,000	31,000	31,000	
	Máximo	57,000	49,000	57,000	
VGM	Média	89,906	89,258	89,587	p(1) = 0,419
	Mediana	91,000	90,000	91,000	
	Desvio padrão	3,073	3,255	3,155	
	Coeficiente de Variação	3,418	3,646	3,521	
	Mínimo	80,000	77,000	77,000	
	Máximo	94,000	92,000	94,000	
HGM	Média	27,781	28,903	28,333	p(2) = 0,017*
	Mediana	27,000	29,000	29,000	
	Desvio padrão	2,393	0,831	1,875	
	Coeficiente de Variação	8,613	2,875	6,617	
	Mínimo	23,000	27,000	23,000	
	Máximo	32,000	31,000	32,000	
CHGM	Média	30,844	32,581	31,698	p(2) = 0,001*
	Mediana	30,500	32,000	32,000	
	Desvio padrão	2,065	1,689	2,068	

Coefficiente de Variação	6,694	5,184	6,524
Mínimo	28,000	31,000	28,000
Máximo	35,000	39,000	39,000

(*): Diferença significativa a 5,0%.

(1): Através do teste t-Student com variâncias iguais.

(2): Através do teste t-Student com variâncias desiguais.

4.3.2 Série Branca

Foram analisadas na séria branca sanguínea as variáveis: leucócitos, bastonetes, neutrófilos, linfócitos, eosinófilos e monócitos. Foi observado diferenças significante para todas as variáveis analisadas. O número de leucócitos do grupo exposto a pesticidas estava abaixo das taxas consideradas normais, indicando um quadro de leucopenia, enquanto que taxas do grupo controle estavam na faixa de normalidade. Achados esses, também foram encontrados nos percentuais de neutrófilos, onde os valores abaixo do normal foi bem mais elevado no grupo exposto do que no grupo controle (53,1% x 6,5%) respectivamente, enquanto que o maior percentual de taxas normais de neutrófilos ocorreram nos indivíduos do grupo controle (83,9% x 46,9%) respectivamente. Enquanto que os bastonetes para ambos os grupos, encontram dentro das taxas de normalidade, apresentado uma pequena elevação nos indivíduos do grupo controle ($p = 0,024$). Os eosinófilos encontravam-se elevados no grupo exposto em relação ao grupo controle (40,6% x 19,4%) respectivamente, e com valores abaixo da normalidade no grupo controle quando comparados ao grupo exposto (32,3% x 6,3%) (Tabela 17).

Nos linfócitos houve aumento nos indivíduos do grupo controle quando comparado aos indivíduos de grupo exposto (51,6% x 12,5%) respectivamente, e os maiores percentuais ocorreram na faixa de normalidade encontrados nos indivíduos do grupo exposto a pesticidas em relação ao grupo controle (87,5% x 48,4%) respectivamente (Tabela 17).

Em relação aos monócitos pode-se comprovar um percentual maior de indivíduos no grupo exposto com valores abaixo do normal quando comparados aos indivíduos do grupo controle (28,1% x 6,5%) respectivamente (Tabela 17).

Tabela 17 – Avaliação das variáveis: neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e monócitos segundo o grupo.

Variável	Grupo				Grupo Total		Valor de p
	Teste		Controle		n	%	
	n	%	n	%	n	%	
Leucócitos							
Abaixo	14	40,6	-	-	13	20,6	p(1) < 0,001*
Normal	19	54,5	27	87,1	27	87,1	
Acima	-	-	4	12,9	4	12,9	
Neutrófilos							
Abaixo	17	53,1	2	6,5	19	30,2	p(1) < 0,001*
Normal	15	46,9	26	83,9	41	65,1	
Acima	-	-	3	9,7	3	4,8	
Bastonetes							
Abaixo	-	-	-	-	-	-	p(1) = 0,492
Normal	32	100,0	30	96,8	62	98,4	
Acima	-	-	1	3,2	1	1,6	
Eosinófilos							
Abaixo	2	6,3	10	32,3	12	19,0	p(2) = 0,018*
Normal	17	53,1	15	48,4	32	50,8	
Acima	13	40,6	6	19,4	19	30,2	
Linfócitos							
Abaixo	-	-	-	-	-	-	p(2) = 0,001*
Normal	28	87,5	15	48,4	43	68,3	
Acima	4	12,5	16	51,6	20	31,7	
Monócitos							
Abaixo	9	28,1	2	6,5	11	17,5	p(1) = 0,025*
Normal	23	71,9	27	87,1	50	79,4	
Acima	-	-	2	6,5	2	3,2	
TOTAL	32	100,0	31	100,0	63	100,0	

(*): Diferença significativa a 5,0%.

(1): Através do teste exato de Fisher.

(2): Através do teste Qui-quadrado de Pearson

Considerando as médias e medianas das variáveis hematológicas da série branca das células sanguíneas, identificamos que as médias de leucócitos, neutrófilos e monócitos foram inferiores nos indivíduos do grupo exposto a pesticidas quando relacionadas aos indivíduos do grupo controle, porém com diferença significativa somente para as variáveis leucócito e neutrófilo, confirmando presença de leucopenia nos indivíduos exposto a pesticidas (Tabela18).

Apesar da média de eosinófilos ter mostrado mais elevada no grupo exposto, a mesma não apresentou diferença significativa em comparação ao grupo controle. Em relação a a média de linfócitos foi observado um aumento significativo nos indivíduos do grupo controle em detrimento a média dos indivíduos do grupo exposto a pesticidas (Tabela 18).

Tabela 18 – Análise estática das variáveis: leucócitos, neutrófilos, bastões, eosinófilos, linfócitos e monócitos segundo o grupo.

Variável	Estatística	Grupo			Valor de p
		Exposto (n = 32)	Controle (n = 31)	Grupo Total (n = 63)	
Leucócitos	Média	5587,500	8351,613	6947,619	p(1) < 0,001*
	Mediana	5450,000	8600,000	7100,000	
	Desvio padrão	1929,692	1479,385	2204,823	
	Coeficiente de Variação	34,535	17,714	31,734	
	Mínimo	2100,000	5300,000	2100,000	
	Máximo	9300,000	12100,000	12100,000	
Neutrófilos	Média	2568,375	4244,742	3393,254	p(1) < 0,001*
	Mediana	2320,000	4160,000	3500,000	
	Desvio padrão	1181,237	1119,713	1420,570	
	Coeficiente de Variação	45,991	26,378	41,864	
	Mínimo	672,000	2352,000	672,000	
	Máximo	4898,000	6600,000	6600,000	
Bastonetes	Média	62,000	172,000	144,500	p(1) = 0,226
	Mediana	66,000	93,500	80,500	
	Desvio padrão	15,427	169,395	153,331	
	Coeficiente de Variação	24,882	98,485	106,111	
	Mínimo	40,000	62,000	40,000	
	Máximo	76,000	656,000	656,000	
Eosinófilos	Média	381,781	263,323	323,492	p(1) = 0,077
	Mediana	262,000	213,000	228,000	
	Desvio padrão	301,741	211,259	265,863	
	Coeficiente de Variação	79,035	80,228	82,185	
	Mínimo	70,000	53,000	53,000	
	Máximo	1392,000	980,000	1392,000	
Linfócitos	Média	2429,156	3326,452	2870,683	p(2) < 0,001*
	Mediana	2348,000	3096,000	2840,000	
	Desvio padrão	649,113	1112,222	1006,837	
	Coeficiente de Variação	26,721	33,435	35,073	
	Mínimo	1155,000	1325,000	1155,000	
	Máximo	3906,000	6565,000	6565,000	
Monócitos	Média	203,750	588,355	393,000	p(1) = 0,105
	Mediana	205,500	324,000	258,000	
	Desvio padrão	119,355	1315,877	939,430	
	Coeficiente de Variação	58,579	223,653	239,040	
	Mínimo	38,000	53,000	38,000	
	Máximo	465,000	7608,000	7608,000	

(*): Diferença significativa a 5,0%.

(1): Através do teste t-Student com variâncias iguais.

(2): Através do teste t-Student com variâncias desiguais.

4.3.3 Ferro e Ferrita

Analisando os resultados obtidos dos valores da concentração de Ferro sérico e Ferritina na população estudada, foi identificado que não houve diferença significativa entre os grupos pesquisados para as dosagens de ferro e nem para as dosagens de ferritina ($p > 0,05$) (Tabela 19).

Tabela 19 – Avaliação da concentração de ferro e ferritina segundo o grupo

Variável	Grupo						Valor de p	OR (IC a 95%)
	Exposto		Controle		Grupo Total			
	n	%	n	%	n	%		
Ferro								
Baixo	10	31,3	9	29,0	19	30,2	p(1) = 0,848	1,11 (0,38 a 3,26)
Normal	22	68,7	22	71,0	44	69,8		
Ferritina								
Normal	30	93,8	31	100,0	61	96,8	p(2) = 0,492	**
Alterado	2	6,3	-	-	2	3,2		
TOTAL	32	100,0	31	100,0	63	100,0		

(**): Não foi possível determinar devido à ocorrência de frequência nula.

(1): Através do teste Qui-quadrado de Pearson.

(2): Através do teste Exato de Fisher.

4.4 - Alterações Hepáticas

4.4.1 Avaliação da AST, ALT e GGT

Foram realizadas as provas de função hepática básica, que incluiu com as avaliações de AST, ALT e GGT. Para ambos os grupos foram medidas as concentrações e categorizadas como normal ou alterada. Observando os resultados foi verificado - que os percentuais de indivíduos com AST foram aproximadamente iguais entre os dois grupos (93,8% no grupo exposto e 93,5% no grupo controle). Todos os indivíduos do grupo exposto a pesticidas (100%) apresentaram ALT

normal e os indivíduos do grupo controle apresentaram um percentual de 93,5%, diferença estatisticamente não significativa entre os grupos. A avaliação da concentração de GGT demonstrou não haver diferenças entre os grupos estudados, já que o percentual de indivíduos com GGT normal foi apenas 9,0% mais elevado no grupo controle quando comparado ao grupo exposto (78,1% x 87,1%). Esses resultados demonstram que as provas de função hepática para ambos os grupos encontram-se iguais, dentro dos padrões de normalidade ($p > 0,05$).

Tabela 20 – Avaliação das variáveis: AST, ALT e GAMA nos indivíduos expostos e não expostos a pesticida.

Variável	Grupo						Valor de p	OR (IC a 95%)
	Casos		Controle		Grupo Total			
	n	%	n	%	n	%		
• AST (U/L)								
Normal	30	93,8	29	93,5	59	93,7	$p^{(1)} = 1,000$	1,03 (0,14 a 7,84)
Alterado	2	6,3	2	6,5	4	6,3		
• ALT (U/L)								
Normal	32	100,0	29	93,5	61	96,8	$p^{(1)} = 0,238$	**
Alterado	-	-	2	6,5	2	3,2		
• GAMA (U./L)								
Normal	25	78,1	27	87,1	52	82,5	$p^{(2)} = 0,348$	1,00
Alterado	7	21,9	4	12,9	11	17,5		
TOTAL	32	100,0	31	100,0	63	100,0		

(**): Não foi possível determinar devido à ocorrência de frequências muito baixas.

(1): Através do teste Exato de Fisher.

(2): Através do teste Qui-quadrado de Pearson.

Considerando a média e mediana dos parâmetros analisados das provas de função hepática podemos identificar que não houve diferenças estatisticamente significativa entre os grupos pesquisados. Destacando que as médias de ALT foram aproximadamente iguais entre os dois grupos e que as médias de AST e ALT foram correspondentemente mais elevadas no grupo dos indivíduos expostos do que no grupo controle, sendo que a maior diferença ocorreu na variável AST com valor 3,63 mais elevada no grupo exposto (25,53 x 21,90) ($p > 0,05$).

Tabela 21 – Estatística das variáveis: AST, ALT e GGT nos indivíduos expostos e não expostos a pesticida, segundo a média e mediana

Variável	Estatística	Grupo			Valor de p
		Casos (n = 32)	Controle (n = 31)	Grupo Total (n = 63)	
• AST	Média	25,53	21,90	23,75	p ⁽¹⁾ = 0,075
	Mediana	24,00	20,00	21,00	
	Desvio padrão	7,70	8,21	8,10	
	Mínimo	16	11	11	
	Máximo	50	55	55	
• ALT	Média	18,53	18,52	18,52	p ⁽¹⁾ = 0,995
	Mediana	18,00	16,00	16,00	
	Desvio padrão	6,28	11,49	9,15	
	Mínimo	10	10	10	
	Máximo	33	59	59	
• GAMA	Média	21,72	18,29	20,03	p ⁽¹⁾ = 0,315
	Mediana	17,50	16,00	17,00	
	Desvio padrão	16,33	9,53	13,43	
	Mínimo	11,00	10,00	10,00	
	Máximo	103,00	54,00	103,00	

(1): Através do teste t-Student com variâncias iguais.

Extraindo apenas os valores de AST, ALT e GGT dos indivíduos que apresentaram valores dentro das taxas de normalidade, observamos que as médias foram correspondentemente mais elevadas no grupo dos indivíduos exposto a pesticidas do que dos indivíduos do grupo controle. Analisando a média da transaminase AST foi identificado que houve diferença significativa para o grupo exposto quando comparado ao grupo controle, valores de 23,97 x 20,14 respectivamente, sendo esta a única variável que apresenta diferença significativa entre os grupos pesquisados a 5,0%.

Tabela 22 – Análise das variáveis TGO, TGP e GGT nos indivíduos expostos e não expostos a pesticida, que apresentavam valores considerados normais

Variável	Estatística	Grupo			Valor de p
		Casos	Controle	Grupo Total	
• AST	Média	23,97	20,14	22,08	$p^{(1)} = 0,002^*$
	Mediana	23,50	20,00	21,00	
	Desvio padrão	4,78	4,26	4,89	
	Mínimo	16,00	11,00	11,00	
	Máximo	36,00	27,00	36,00	
• ALT	Média	18,53	15,97	17,31	$p^{(1)} = 0,109$
	Mediana	18,00	16,00	16,00	
	Desvio padrão	6,28	6,02	6,24	
	Mínimo	10,00	10,00	10,00	
	Máximo	33,00	40,00	40,00	
• GAMA	Média	16,32	15,30	15,79	$p^{(1)} = 0,348$
	Mediana	16,00	16,00	16,00	
	Desvio padrão	3,73	4,04	3,89	
	Mínimo	11,00	10,00	10,00	
	Máximo	26,00	25,00	26,00	

(*): Diferença significativa a 5,0%.

(1): Através do teste t-Student com variâncias iguais.

4.5 Parasitológico de Fezes

Analisando os exames laboratoriais referentes a investigação parasitológica dos indivíduos pesquisados, observamos que os resultados encontrados dos indivíduos do grupo exposto indicam presença de verminose estatisticamente significativa quando comparado com os resultados observados no grupo controle. Foram encontrados vermes do tipo *Ascaris lumbricoides*.

Tabela 23 Parasitológico de fezes dos indivíduos expostos e não expostos a pesticidas

Resultado do exame parasitológico	Grupo Exposto		Grupo Controle		Valor de p
	n	%	n	%	
Positivo	26	81,3	2	6,5	$p^{(1)} < 0,001^*$
Negativo	6	18,7	29	93,5	
	32	100,0	31	100,0	

(*): Diferença significativa a 5,0%.

(1): Através do teste Qui-quadrado de Pearson

4.6 Pesticidas utilizados na lavoura

Após aplicação do questionário foi identificado que a população estudada utilizava amplamente pesticidas, sendo relatado o uso do Folisuper® (paration-metilico) pertencente à família dos organofosforados e do Roundup® (glifosato), ambos considerados tóxicos para saúde dos trabalhadores.

4.7 Resultados preliminares da formação do micronúcleo pelo Método de Fish

Observando os resultados preliminares podemos identificar que os micronúcleos formados no grupo exposto a pesticidas são de origem de cromossomos inteiros, ou seja se formaram por aneuploidia, já que apresentavam fluorescência para um centrômero cromossômico, demonstrando a perda de algum cromossomo (C+ MN) (Figura 15). Enquanto que quando não marcado por fluorescência, os micronúcleos representam fragmentos cromossômicos, visto que não envolveu o centrômero do cromossomo (C- MN) (Figura 16) (Tabela 24).

Tabela 24 – Análise parcial da formação do micronúcleo (MN) pelo método de Fish para o grupo exposto.

Grupo exposto	Número de MN/1000	C+MN	C-MN
1	18	17	1
2	22	20	2
3	24	23	1
4	23	19	4
5	22	20	2
6	17	17	0
7	15	14	1
8	13	11	2
9	10	10	0
10	8	7	1
11	22	20	2
12	34	30	3
13	23	19	4
14	22	22	0
.	.	.	.
.	.	.	.

Figura 15 – Cromossomo Inteiro (C + MN)

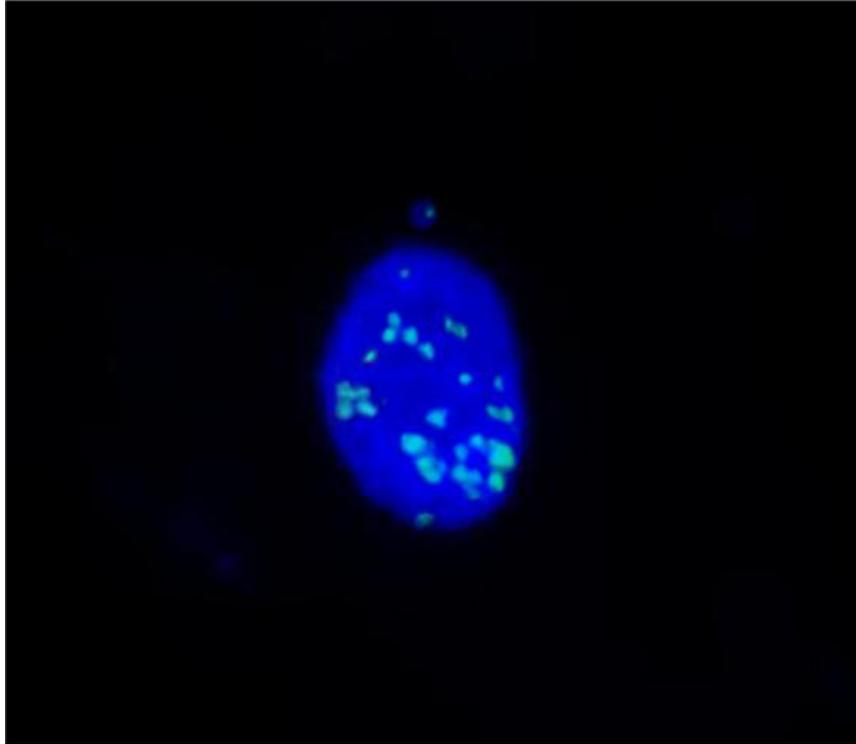
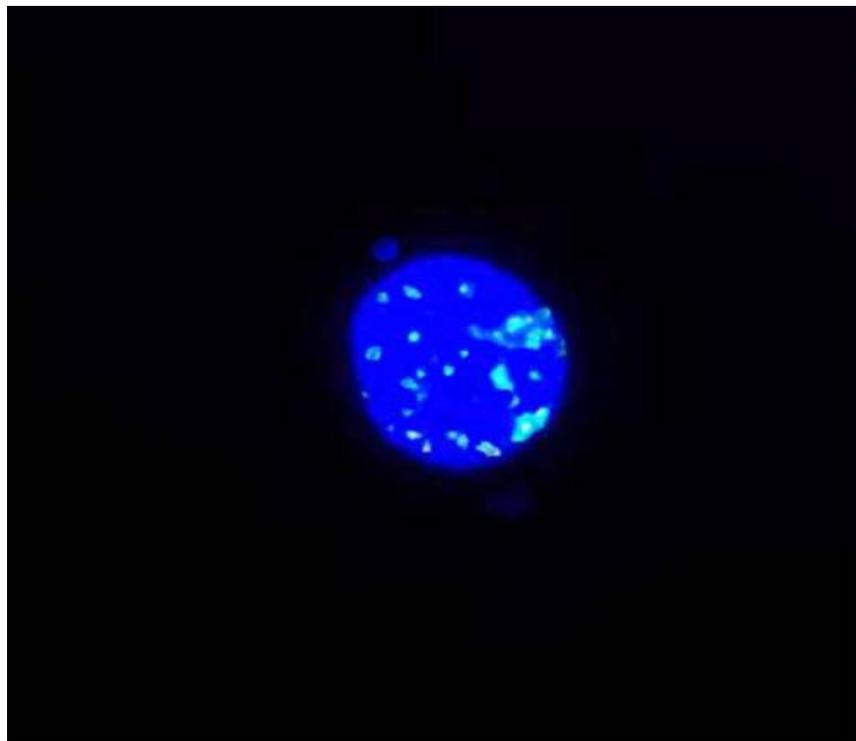


Figura 16 – Fragmento de Cromossomo (C – MN)



5 DISCUSSÃO

O biomonitoramento humano é um método de estudo eficiente e de custo reduzido, onde nos permite obter informações a cerca da exposição humana a agentes químicos, supostos de ação mutagênica e carcinogênica, tornando-se um instrumento ideal para avaliação e gestão de risco ao ser humano (Angerer *et al.* 2007)

Esses estudos envolvem grupos de comparação externo, os quais apresentam frequentes problemas relacionados à seleção dos objetos amostrais (*bias* de seleção), observados em pesquisas onde não ocorrem a homogeneização dos fatores extrínsecos entre os pesquisados. Segundo Regan (2000) para minimizar esse tipo de viés, as informações do grupo controle devem possuir um maior grau de semelhança entre as diversas características compartilhadas com o grupo testado, diferindo apenas no aspecto a ser investigado.

Nessas pesquisas as investigações citogenéticas são bastante influenciadas por fatores externos, os quais podem atuar como agentes mutagênicos, potencializando a gênese e aumentando a frequência das lesões ao DNA induzida por agentes diretos, podendo mascarar os resultados e influenciar nas conclusões (LIOU, 2002). Neste trabalho os critérios de inclusão e exclusão dos indivíduos submetidos a estudo foram bastantes criteriosos uma vez que, Lubs e Samuelson (1967) chamaram a atenção para a relação direta entre idade e taxas de alterações cromossômicas. Durante a faixa etária até trinta anos, a média da frequência de alterações cromossômicas espontâneas em pessoas “sem riscos ocupacionais ou ambientais” varia de 0,72 – 1,42%, enquanto para pessoas entre 30 – 45 anos de idade essa relação aumenta para 0,93 – 1,9% e idades superiores a 45 - 50 anos esses valores situam-se entre 3 – 4 % de alterações cromossômicas as quais não conseguem ser reparadas pelo sistema enzimático (MATTEI *et al.* 1979; MARLHENS *et al.* 1986). Em decorrência disso, esse trabalho teve como critérios de inclusão, a média de idade do grupo em 30 anos, minimizando dessa forma a variável idade como fator de conflito de resultado (Tabela 1), prevenindo uma possível discrepância nos resultados encontrados.

Foi considerado também que, hábitos sociais podem atuar como importantes fatores na gênese de lesões ao DNA, entre eles o tabagismo e o consumo de bebidas alcoólicas, que de modo individual ou conjuntamente, elevam significativamente as chances de ocorrências de alterações genéticas (BILBAN, 1998; REIS *et al.* 2002;. WU *et al.* 2004; FREITAS *et al.* (2005); SAILAJA *et al.* 2006). Além de poder induzir aumento no número de células apoptóticas no epitélio de cavidade oral (SCHWARTZ *et al.* 2003). Desse maneira, nessa pesquisa foram excluídos os voluntários que apresentavam esses hábitos, já que sabiamente poderiam levar a alterações cromossômicas. Além disso, outro fator relevante foi a não inclusão de pessoas com história de toxoplasmose, hepatites e rubéola, pois conforme descrito por Daffos *et al.* (1988) e por Kuller *et al.* (1996) apresentam maior probabilidade de possuir alterações cromossômicas.

Tendo conhecimento, de acordo com os estudos de Gebhart (1970), de que alguns componentes físicos e químicos influenciam o DNA e seu sistema de reparo, e que a ação de certas drogas, terapêuticas ou não apresentam potencial para atuar como agentes indutores de quebras e outras alterações cromossômicas. É que durante a seleção dos voluntários desse trabalho foram excluídos os indivíduos que, tinham utilizado possíveis compostos químicos, os quais possuíam ação direta ou indireta sobre o material genético, além daqueles que tinham realizados procedimentos de radiografias recentes (até três meses) e/ou radioterapia pelo menos uma vez na vida (THERMAN; SUSMAN 1996; CERQUEIRA *et al.*(2004))

Os estudo de biomonitoramento vem sendo realizados em homens, animais e culturas de células, os quais foram previamente expostos aos fatores ocupacionais, ambientais ou experimentais, ou a compostos supostamente tóxico para o material genético. Um dos primeiros estudos nessa área, os testes citogénéticos começaram a surgir, foram os realizados com mercúrio, os quais forneceram informações, sobre as agressões ao DNA em indivíduos expostos. Nesse momento, surgiam as investigações toxicogenéticas, passando a contribuir para o esclarecimento dos reais riscos das populações supostamente expostas a substancias carcionogênicas.

É sabido que nos países em desenvolvimento os agricultores estão sob maior risco de exposição aos pesticidas devido as más condições de trabalho e a falta de consciência sobre o real perigo no manuseio e aplicação dos mesmos. A exposição ocupacional a pesticidas é bastante freqüente entre agricultores, principalmente

pequenos agricultores, que na sua maioria desconhecem os riscos inerentes ao produto que utilizam na sua lavoura, para combater pragas. Os riscos são aumentados pela falta do uso de equipamentos de proteção individuais (EPIs) durante o manuseio, aplicação e estocagem dos agrotóxicos. Esse fato pode ser evidenciado nesse trabalho, onde a maioria dos agricultores entrevistados não usavam os EPIs, demonstrando uma exposição ocupacional pelas vias respiratórias e dérmicas, já que 56,7% dos entrevistados declararam não usarem Equipamento de Proteção Individual, sendo este um fator limitante para maioria. Nas sete visitas a comunidade os indivíduos estavam com os pés no chão, e sem uso de luvas, máscaras ou qualquer outro EPI. (Anexo C.3) A ausência dos EPI tem sido descrita por Carvalho (1991) , onde na Bahia 71,7% dos trabalhadores envolvidos na aplicação de pesticida não usam EPI adequadamente. Enquanto que Farias *et al.* (2007) identificaram que $\geq 94\%$ dos trabalhadores usavam equipamentos de proteção durante as atividades com agrotóxicos Os mecanismos de intoxicações por vias aéreas tem se evidenciado em trabalhos anteriores (NUNES; TAJARA, 1998).

Entretanto, tem se evidenciado uma redução nas incidências a intoxicação, pelo fato de se ter maior conhecimento dos riscos a manipulação desses químicos, são desde a sua fabricação até uso, havendo teoricamente uma maior precaução em seu uso e manipulação. Porém, os últimos dados no Estado da Bahia mostram que os óbitos por intoxicação ocupacional, são a terceira causa de intoxicação por esses agentes, atrás da intoxicação por tentativa de suicídio. Isso pode ser considerado, pelo fato de que o trabalhador rural na sua grande maioria apresenta baixo nível escolar. Nesse trabalho pode ser evidenciado que a maioria dos agricultores (81,2%) apresentavam em média 4 anos de estudo, o que segundo Oliveira-Silva *et al.* (2001) dificulta a leitura e interpretação das informações contidas nos rótulos além das mesmas apresentarem conteúdos técnicos de difícil entendimento.

A importância dos EPI foi descrita por Bull *et al.* (2006) onde investigaram a relação de uso de EPIs e danos genéticos. Eles puderam concluir que o uso de medidas de proteção individual (>60%) levavam a resultados negativos para a presença a danos ao DNA. Porém sete dos oitos estudos onde ficou evidenciado o uso inadequado ou ausência dos equipamentos de proteção, puderam observar um aumento estatisticamente significativo de danos citogenéticos. Sugerindo que o uso

dos EPIs produzem algum grau de proteção na prevenção da exposição ocupacional.

A ausência de medidas de proteção individual parece ser uma atitude de locais onde o nível sócio-econômico e educacional estão abaixo do desejável para o ser humano, trazendo dessa forma sérios prejuízos a saúde. Contudo para Bortoli *et al.* (2009) o uso dos EPIs não foi claramente relacionado sobre o número de micronúcleos encontrados, porque não houve diferenças entre os indivíduos que relataram usar e aqueles que não utilizavam esse tipo de proteção. Para esse estudo e para o nosso também, acreditamos que os resultados encontrados podem não refletir a real condição do uso dos EPIs na lavoura no seu dia a dia.

De um modo geral, a exposição aos pesticidas pode produzir uma variedade de sintomas não específicos que pode ser facilmente confundido com várias outras patologias. Após contaminação aguda os sintomas são mais específicos e de mais fácil correlação, porém nas exposições de baixas intensidades e contínuas esses sintomas são mais discretos e de difícil diagnóstico. Segundo Edwards e Tchounwou (2005) avaliando os efeitos sobre a saúde de trabalhadores expostos a pesticidas identificaram que após duas semanas de aplicação os trabalhadores relatavam sentir dor de cabeça (30%), náuseas (29%), insônia (28%), inquietação (23%), diarreia (26%), dificuldade de respirar (21%), tonturas (21%), cólicas abdominais (11%), ausência de coordenação motora (11%), excesso de salivação (9%) e confusão mental (7%), sendo considerados sintomas clássicos após uso de organofosforados. Por outro lado, no grupo estudado nesse trabalho foi relato cefaléia após aplicação imediata em 18% de indivíduos expostos, enquanto que mais de 50% dos entrevistados relatou não sentir nenhum outro sintoma. Esses dados corroboram com os achados de Rojas *et al.* (1996) onde, relatou que 51,52% dos trabalhadores investigados não apresentavam sintomas de toxicidade após aplicação, e que a fadiga e cefaléia eram os sintomas mais prevalentes (15,15% e 6,06%) respectivamente.

Baseado nos parâmetros acima descritos, o próximo desafio é definir qual investigação mutagênica “in vivo” será escolhida para análise toxicogenética. Essa escolha deve ser baseada na condição de que a célula selecionada tenha sofrido ação direta dos agentes supostamente genotóxico e se elas apresentam-se aptas a serem cultivadas “in vitro” ou manuseadas sem perder suas informações genéticas originais. Awa (1975) constatou que indivíduos japoneses, quando investigados vinte

e cinco anos após exposição a bomba de Hiroshima e Nagasaki, ainda apresentavam em suas células metafásicas um exacerbado aumento na incidência de complexas alterações cromossômicas, comprovando desde essa época a viabilidade e credibilidade da utilização de linfócitos periféricos em pesquisa de mutagenicidade em indivíduos provenientes de exposições progressas.

Nessa pesquisa, foi utilizado o Teste de Aberrações Cromossômicas (AC), onde foi evidenciado uma notória ação clastogênica dos pesticidas no grupo avaliado. A análise citogenética aferiu um aumento significativo na prevalência das taxas de alterações cromossômicas no grupo exposto a pesticidas, apresentando aberrações cromossômicas em 43,7 % da população avaliada, em detrimento a ausência dessas alterações no grupo controle (Tabela 4). Das 3.200 metafases analisadas no grupo exposto foram encontradas 105 metafases com alterações numéricas cromossômicas (3,3%), fato esse não observado nas 3.100 metafases analisadas do grupo controle (Tabela 5). Esses achados corroboram com a investigação de Varona *et al.* (2003), em que encontraram um média de 26,2% dos indivíduos expostos a pesticidas com alterações cromossômicas, com taxas de aberrações variando de 1 a 4% em cada 100 metafase analisadas. Ao contrário de Heepchantree *et al.* (2005) que investigaram populações com exposição ocupacional, com alto e baixo risco para câncer de pulmão, não encontraram diferenças significativas no percentual de células com aberrações cromossômicas.

Ao comparar as taxas de percentuais de alterações cromossômicas com as de outras pesquisas que investigam danos ao DNA, foi observado que pela idade dos pesquisados nossos valores (3,3% de metafases com alterações cromossômicas), encontram-se em concordância com os de outros indivíduos que sofreram exposição ocupacional ou ambiental. Sailaja *et al.* (2006) identificou uma prevalência de 8,43% nas taxas de alterações cromossômicas em comparação ao grupo de referência (3,32%). Enquanto, Varona *et al.* (2003) observaram taxas de 1 a 4% no grupo exposto. Já, Gonçalves *et al.* (2005) encontraram taxas AC, de todos os 19 trabalhadores estudados, acima de 4%. Por outro lado, Garaj-Vrhovac e Zeljezic (2002) encontraram um percentual de número de aberrações cromossômicas de 7,8% (5,0-11,0%), valores esses significativamente mais alto que o grupo controle, sugerindo que a exposição ocupacional por longo tempo pode causar danos genômicos mais elevados em células somáticas, representando dessa forma um risco para a saúde humana.

Essa atividade mutagênica e genotóxica dos pesticidas foi demonstrada em diversos estudos, em que avaliaram sua capacidade de desenvolver aberrações cromossômicas (ANWAR, 1997; JOKSIC *et al.*, 1997; VARONA *et al.*, 2003; KNUDSEN; HANSEN, 2007; ZELJESIC; GARAJ – VRHOVAC, 2004; RAMIREZ; ABARCA, 1993; ZAPATA *et al.*, 1987). Fato de extrema importância, pois o desenvolvimento de um câncer se deve as alterações no material genético, decorrentes de exposição a alguma substância com ação genotóxica. (DOLL e PETO, 1981; GONZÁLES *et al.*, 1990; BOLOGNESI; MARASSO, 2000; KNUDSEN; HANSEN 2007).

Além do teste de aberrações cromossômicas, o teste do micronúcleo tem sido uma valiosa ferramenta metodológica para avaliar a ocorrência de danos cromossômicos e sua relação com a carcinogênese, podendo ser executado em linfócitos de sangue periférico, em células de medula óssea, assim como em células esfoliadas de diversos tecidos (CERQUEIRA *et al.* 1998; HOLLAND *et al.* 2008). As células bucais são consideradas as primeiras barreiras pós inalação e ingestão de agentes potencialmente genotóxicos, e no epitélio oral os micronúcleos são considerados importantes biomarcadores do risco de desenvolvimento de câncer e sua progressão. (HOLLAND *et al.* 2008). O epitélio bucal é composto de quatro camadas (camada basal, espinhosa, intermediária e superficial), as células são mantidas pela renovação celular contínua, no qual novas células são produzidas por mitoses na camada basal e migram para a camada superficial onde por descamação são eliminadas do organismo. Essas células descamadas podem refletir eventos genotóxicos acontecidos a uma ou a três semanas anteriores. Em muitos estudos tem sido reportado um aumento significativo no número de micronúcleo nesses tipos de células, dos indivíduos expostos a substâncias suspeitas de genotoxicidade quando comparado ao grupo controle (Martins *et al.* 2009).

Hábitos como o tabagismo e o consumo de álcool podem atuar como importantes fatores nas lesões ao DNA, aumentando as chances de ocorrência de micronúcleos (REIS *et al.* 2002; REIS *et al.* 2004, WU *et al.* 2004; DÓREA 2007). Para minimizar essa ocorrência nessa pesquisa, foram excluídos dos grupos de estudo indivíduos que relataram ser tabagista ou que consumirem bebidas alcoólicas, dessa forma homogenizando e unificando as populações estudadas. A ocorrência de micronúcleos, na grande maioria das pesquisas, não estabelece relação entre sexo e frequência de micronúcleos (HE *et al.* 2000; FENECH *et al.*

2001), o que foi seguido aqui. E segundo Pastor *et al.* (2002) e Torres-Bugárin *et al.* (2003) o aumento da idade favorece a um aumento do número de micronúcleos. Aqui, prevendo esse viés a população estudada apresentou médias de idades sem diferenças significativas (Tabela 1).

Nos estudos de Sailaja *et al.* (2006); Celik e Kanik (2006); Kehdy *et al.* (2007); Costa *et al.* (2007); Remor *et al.* (2008); Bolognesi *et al.* (2009); Bortoli *et al.* 2009 avaliando indivíduos exposto a pesticidas observaram um aumento no número de micronúcleos nos indivíduos expostos quando comparados ao grupo controle, confirmando a associação entre danos genotóxicos e exposição ocupacional a pesticidas. Entretanto, nesse estudo não foi observado diferença estatisticamente significativa na frequência de micronúcleo ($X^2 = 1,9429$; $p = 0,163$) entre o grupo exposto a pesticidas e o grupo controle. Achados esses, semelhante aos encontrados por Pastor *et al.* (2002), quando avaliaram trabalhadores expostos a médio e alto nível de exposição a pesticidas, e não encontraram diferenças significantes em comparação com o grupo controle. Resultados também encontrados, nos estudos de Pastor *et al.* (2001); Lucero *et al.* (2000); Pastor *et al.* (2003). Do ponto de vista de Bortoli *et al.* (2009) resultados conflitantes em biomonitoramento de indivíduos expostos a pesticidas pode ser reflexo das condições de exposição, magnitude de exposição, o uso ou não de equipamentos de proteção e do potencial genotóxico dos pesticidas utilizados. Aliado ao fato de que existem poucos estudos sobre os efeitos dos pesticidas utilizando células esfoliadas de mucosa bucal.

O grupo exposto avaliado em nosso estudo utilizava os pesticidas glifosato (considerado pelo fabricante como pouco tóxico) e o paration-metílico (organofosforado). De acordo com Bull *et al.* (2006) e Bolognesi *et al.* (2009) o glifosato tem apresentado propriedades genotóxica e com potencial de induzir micronúcleo em células esfoliadas de mucosa bucal. Confirmando desse modo sua capacidade de induzir a longo prazo alterações sobre a saúde humana. Porém, nessa população estudada mesmo utilizando glifosato, não foi encontrado essas alterações (diferenças significativas de micronúcleos em células esfoliadas de boca entre os grupos estudados). No entanto, o fato de não se utilizar isoladamente um único pesticida na lavoura brasileira, o que pode ser identificado em nosso estudo é que além do glifosato, eram usados outros como o organofosforado (que segundo os estudos de Cakir e Sarikaya (2005) são capazes de induzir genotoxicidade), o

que inviabiliza atribuir os efeitos encontrados a este ou aquele pesticida, indicando perigo genotóxico a nível de grupo (BOLOGNESI, 2003).

Vale ressaltar que, a presença de micronúcleos em células esfoliadas de mucosa bucal assim como outras alterações nucleares, reflete os eventos genotóxicos que ocorreram em células que estavam na camada basal do epitélio bucal uma a três semanas antes da coleta e confecção da lâmina para estudo. Representado, deste modo uma exposição recente a carcinógenos ou um reparo frente a erros espontâneos durante a duplicação do DNA. Apesar de existir uma variação inter-individual na ocorrência de micronúcleos e das alterações nucleares, seu aumento em pesquisas deve ser aceito como um reflexo da ação de agentes clastrogênicos (STICH; ROSIN, 1983; TOLBERT *et al.* 1991; HOLLAND *et al.* 2008).

Segundo Tolbert *et al.* (1992) e Holland *et al.* (2008) outro fator a ser investigado além dos micronúcleos, são as alterações nucleares (cromatina condensada, bronken egg, cariólise, carriorexis e picnose) que representam diferentes fenômenos celulares como, degenerativos e/ou adaptativos próprios do tecido epitelial. Estas células poderiam representar uma resposta a citotoxicidade ou ser secundária a eventos genotóxicos, apesar de que os processos subjacentes ao aparecimento dessas estruturas ainda não são totalmente compreendidos, porém um grande número de publicações tem utilizado essa metodologia. Pois, poderiam identificar que os indivíduos do grupo exposto que apresentavam diferenças significativas no item morte celular (picnose, cariólise e cariorrexix) quando comparado ao grupo controle (MARTINS *et al.*, 2009)

Nessa pesquisa, apesar de não encontrar diferenças significativas no número de micronúcleos entre os grupos pesquisados, foi observado a presença significativa de apoptose, a julgar pelo somatório de picnose, cromatina condensada e cariorréxis ($X^2 = 11,345$; $p = 0,001$); e de necrose (picnose, cromatina condensada, caliólise e cariorréxis) ($X^2 = 10,453$; $p = 0,001$). O que não condiz com o observado por Kehdy *et al.* (2007) onde obtiveram aumento nas freqüências de micronúcleos e presença de necrose nos indivíduos expostos a pesticidas, mas ausência com diferença significativa na análise de apoptose.

A apoptose é um processo biológico que é geneticamente controlado e necessário tanto para o desenvolvimento normal como para o controle da homeostase do tecido. A apoptose induzida por agentes genotóxicos pode ser importante marcador de resposta a eventos iniciadores de câncer, embora esse

fenômeno possa ser relatado na carcinogênese, deveria ser estudado isoladamente, na medida do possível, dada as diferentes de natureza das suas relações com câncer.

A presença de broken-egg foi considerado por Ramirez e Saldanha (2002) como um excelente biomarcador para as análise de genotoxicidade, mas para Cerqueira *et al.* (2004) os bronken eggs estão envolvidos no processo normal da diferenciação celular e seu mecanismo de formação ainda não é bem compreendido. Nessa investigação houve diferenças entre os grupos para a presença de broken-egg, o que pode ser considerado mais um indicativo da ação genotóxica em que os indivíduos pesquisados estão submetidos.

É importante destacar a presença elevada da incidência de cromatina condensada no grupo exposto, em relação ao grupo controle, podendo ser um indicativo de que os indivíduos expostos estão sofrendo maior injúria celular do que simplesmente uma resposta a diferenciação e maturação do epitélio. Também observamos uma maior resposta a queratinização (aumento de cariólise e cromatina condensada) representando uma resposta adaptativa a injúria celular em epitélios não queratinizados. Esses achados confirmam as observações de Tolbert *et al.* (1992), que as alterações nucleares são indicativos de eventos genotóxicos e citotóxicos após exposições (Figura 14).

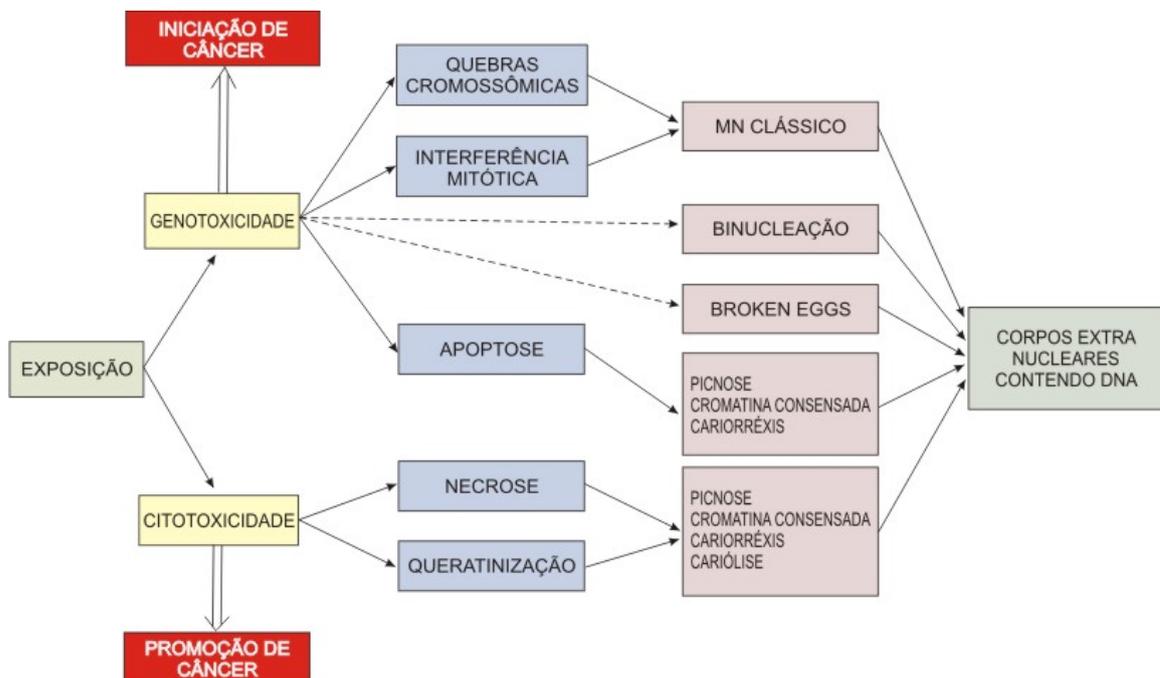


Figura 14 – Diagrama esquemático dos caminhos postulados para produzir corpos extra-nucleares contendo DNA . (Adaptado de Tolbert et al. 1991, 1992).

Aos eventos apoptóticos (picnose, cromatina condensada e cariorrexis) significativos em relação ao grupo controle estudado, podemos entender que os indivíduos expostos ao glifosato e paration-metílico podem estar frente a agentes potencialmente genotóxicos. E que a presença de necrose e queratinização (picnose, cromatina condensada, cariorrexis e cariólise) podem estar relacionados a eventos citotóxico, indicativo de agentes promotores do câncer.

Essas mesmas observações foram feitas por Santos (2003), em que houve maior ocorrência de alterações indicativas de apoptose e necrose, mas não de micronúcleos, em função da exposição ocupacional a agrotóxicos nas células do epitélio oral. O que pode ser visto nos nossos achados, onde a exposição a pesticidas está mais associada a alterações nucleares do que a formação de micronúcleos. De acordo com Freitas *et al.* (2005) e Santos (2003) sob exposições mais intensas a pesticidas a resposta apoptótica é disparada, mascarando a real ocorrência de micronúcleos, justificando a não expressiva presença de micronúcleos face a um aumento de ocorrências de eventos nucleares degenerativos (indicadores de apoptose e necrose), apontando desse maneira, para os efeitos mutagênicos e citotóxicos dos glifosato e do paration-metílico utilizados pelos lavradores pesquisados. Assim, a exposição repetida a agentes citotóxico e/ou genotóxico pode resultar em lesão celular crônica, proliferação celular compensatória, hiperplasia e finalmente o desenvolvimento de uma lesão maligna.

Além dos ensaios realizados, os estudos sobre danos ao DNA frente a pesticidas tem focado a utilização do ensaio do teste cometa em linfócitos de sangue periférico como um excelente biomarcador e tem correlacionado aumento do dano ao DNA com exposição extensiva pesticidas (PACHECO; HACKEL, 2002; MUNIZ *et al.* 2008). O teste cometa é um método visual para detectar danos em células interfásicas, sendo uma técnica especialmente rápida e sensível em captar essas quebras (VALVERDE; ROJAS (2009); HE *et al.* 2009).

Os danos mensurados correspondem a escores de 0 a 4, que segundo Tice *et al.* (2000) a depender da extensão do dano podem ser reparáveis. Foi observado um aumento dos níveis em dano ao DNA no grupo exposto a pesticidas quando comparados ao grupo controle, correspondente a todos os escores. Nos trabalhos de Garaj-Vrhovac e Zeljezic (2000, 2001) foram encontrado aumento dos níveis de danos no DNA em dois estudos em que analisaram linfócitos do sangue periférico de trabalhadores envolvidos na produção de pesticidas, semelhantemente aos

encontrados em nossos resultados. Essa ocorrência pode ser devida a exposição ocupacional a pesticidas, devido a uma ligação covalente com o DNA que pode levar desse modo a alterações cromossômicas, dando início ao processo de carcinogênese (BHALLI *et al.* 2006).

Os danos ao DNA encontrado em nossa pesquisa variaram nos escores 1, 2, 3 e 4, mas com diferença significativa entre os grupos pesquisados, no escore 1 que é indicativo de 5 a 20% de quantidade de dano no DNA, observados nos indivíduos expostos a pesticidas. Sendo encontradas também diferenças entre os grupos no escore 0 (sem dano no DNA) para os indivíduos de grupo controle, indicando que os mesmos não estão sob ação genotóxica até o momento. Esses achados reforçam a idéia de que os pesticidas são potentes substâncias causadoras de lesão ao DNA e que esta população necessita de uma rápida intervenção por parte das autoridades de saúde no que se refere a sua proteção a exposição ocupacional.

Quando comparado o Índice e a Frequência de Danos, avaliados pelo teste cometa, o grupo de trabalhadores expostos a pesticidas apresentou um aumento significativo de danos ao DNA ($p < 0,0001$) quando comparado ao grupo controle, indicando que os mesmos estão sofrendo quebras nas fitas de DNA, e que o uso elevado e repetido de pesticidas, causam danos nas células dos agricultores, independente do tempo que trabalham.

Danos ao DNA tem sido utilizados como biomarcadores nas investigações em que ocorrem exposições a agentes genotóxicos, em particular aos pesticidas, os resultados encontrados nesse trabalho usando os testes do micronúcleo, cometa e aberrações cromossômicas fornecem informações claras, que os indivíduos pesquisados apresentam risco genético associado à exposição aos pesticidas, e que essa evidência salienta a necessidade de programas educacionais para a agricultura baiana e brasileira a fim de reduzir o uso de produtos químicos associados ao uso completo e correto dos equipamentos de proteção.

Durante a pesquisa ficou constatado a necessidade de investigar a saúde básica geral dos pesquisados, uma vez que o câncer surge através de uma rede extremamente complexa de causas múltiplas, e que provavelmente nunca iremos conhecer toda a gama de agentes ou combinações de agentes. Nós sabemos que a prevenção à exposição a agentes cancerígenos pode evitar a doença. As pesquisas relacionadas a causas ambientais e ocupacionais ligadas ao câncer estão crescendo constantemente, e as futuras atualizações serão realizadas à luz da nova

compreensão biológica dos mecanismos de ação dos pesticidas e seus reais riscos a populações humanas.

Atualmente, pouco se tem conhecimento sobre as causas ocupacionais e ambientais do câncer, somente partir de 2007 a Agência Internacional para Pesquisa sobre o Câncer (IARC), identificou 415 agentes cancerígenos conhecidos ou suspeitos. Segundo Titlic *et al.* (2008) após exposição aos pesticidas, vários distúrbios fisiológicos podem se manifestarem, dentre eles diminuição significativa do número de leucócitos e anemia.

A anemia é considerada a doença mais prevalente em todo o mundo, especialmente a caracterizada por carência de ferro, que chega a ser responsável por 95% das anemias. No Brasil, não existem dados disponíveis que possam indicar a exata dimensão do problema no País. A anemia tem sido relatada como a diminuição dos níveis de hemoglobina na circulação, e o hemograma é o principal exame a ser realizado quando há suspeita de anemia. A morfologia anormal das hemácias pode sugerir um diagnóstico, podendo as anemias, serem classificadas de acordo com o tamanho das hemácias, inferido através do volume globular médio (VGM). Assim, é possível classificar como anemia normocítica aquelas que estão dentro do valor de normalidade do VGM, microcíticas aquelas abaixo e macrocíticas as acima, intimamente ligados a esses valores anormais estão as deficiências de ferro e folato, e alcoolismo e certas medicações como metotrexato respectivamente. E nas anemias consideradas normocíticas podem estar relacionadas a anemias aplásicas e secundárias a agressões medulares.

Os trabalhadores que tem sido exposto a pesticidas podem apresentar alterações hematológicas, mudanças envolvendo a quantidade, qualidade e distribuição das células sanguíneas (ALBIANO *et al.* 1986, LERDA; MASIERO, 1990; SANTOS-FILHO *et al.* 2005). No presente estudo foram encontradas alterações bem significativas a nível das células vermelhas e brancas, sua identificação é de extrema importância para a avaliação ou prognóstico do estado geral de saúde do indivíduo.

Foi observado no eritrograma (série vermelha) que é composto por hemácia e seus índices: Volume Globular Médio (VGM), Hemoglobina Globular Média (HGM) e Concentração Hemoglobina Globular Média (CHGM) uma diminuição significativa no nível de hemoglobina em 68,8% dos indivíduos expostos a pesticidas em relação ao grupo controle, em que apenas 29% apresentaram esses índices ($p = 0,001$). Ao

contrário no grupo controle onde 71% dos indivíduos estão com o nível de hemoglobina dentro dos valores normais quando comparado a 25% dos que estavam expostos (Tabela 15). Corroborando com esses achados, Elsadek e Hassan (1999) encontraram no grupo exposto a pesticida uma baixa de hemoglobina significativa quando comparado ao grupo controle, indicando uma possível anemia. Estas observações foram reforçadas por Gamlin *et al.* (2007) e Titlic *et al.* (2008).

Foi possível constatar que não houve nenhuma alteração significativa para o nível de hemácia e hematócrito. Como o número de hemácias esta normal, isso é condizente que o hematócrito também apareça normal, já que este índice é a proporção de hemácias em relação ao plasma.

O HGM (Hemoglobina Globular Média) calcula a quantidade de hemoglobina no interior da hemácia, estando de acordo com o nível de hemoglobina total. Os resultados de HGM no grupo exposto foram baixos em relação ao grupo controle, sendo que no grupo exposto 34,4% dos indivíduos estava abaixo do desejado e no grupo controle todos os indivíduos estavam dentro dos valores normais apresentado diferença significativa. Esses resultados confirmam a anemia dos indivíduos do grupo exposto, apoiado nos baixos índices de CHGM (Concentração de Hemoglobina Globular Média) (Tabela 15 e 16).

Em 59,4% dos indivíduos do grupo investigado, apresentavam o CHGM abaixo do nível normal, contra 90,3% dos indivíduos do grupo controle com o nível normal (Tabela 15). Este índice mede a concentração de hemoglobina de um determinado volume de sangue, indicando mais uma vez a redução significativa de hemoglobina presente nos indivíduos do grupo exposto, sendo mais um achado que confirma o potencial dos pesticidas em provocar anemia nos indivíduos expostos cronicamente a eles.

Esse indicativo de processo anêmico encontrado no grupo exposto poderia estar relacionado a uma deficiência de Ferro, o qual pode ser decorrente a deficiências nutricionais ou parasitoses. Entretanto esse estado anêmico observado nos indivíduos pode não está associado a uma carência nutricional, pois eles se alimentam do próprio cultivo, alimentos ricos em ferro e em outros nutrientes. Este fato foi confirmado quando após avaliação dos níveis de ferro e ferritina, foi verificado que não havia diferenças significativas entre os grupos pesquisados (Tabela 19). Além disso, não foi identificada em nenhum dos grupos pesquisados a

presença de alterações a nível do tamanho das hemácias (VGM) (Tabela 15 e 16), descartando a possibilidade de uma anemia megaloblástica, provocado pela carência de vitamina B12 ou de ácido fólico no organismo. Esses achados poderiam sugerir que essa anemia pudesse ser decorrente da atividade genotóxica dos pesticidas no gene, que regula a produção de hemoglobina em resposta a agressão.

Desde de 1983, Ratner *et al.* tem sugerido que a presença de pesticidas nos alimentos e frutas consumidos diariamente, poderia conduzir a aumento significativo de supressão de medula óssea em indivíduos normais. E segundo Ahamed *et al.* (2006) esta exposição a pesticidas pode culminar em anemia aplástica, enquanto para LaFiura *et al.* (2007) em leucemias. Law *et al.* (2006) estudando os casos de anemia aplástica adquirida (AAA) em doentes com uma longa história de exposição a pesticidas de áreas agrícolas, identificaram pacientes apresentando grau moderado a severo de aplasia de medula óssea, como resultado decorrente de 9 -12 anos de exposição prolongada a pesticidas, expostos basicamente a uma mistura composta por organofosforados e compostos organoclorados. Esse tempo de exposição coincide com a média de exposição encontrada no grupo exposto, dos nossos pesquisados que foi de 13,5 anos.

Além da série vermelha, a série branca das células sanguíneas (leucograma), também foi avaliado, Houve uma diminuição significativa no grupo exposto comparando com o grupo controle. Indicando uma leucopenia no grupo estudado (Tabela 17 e 18). A leucopenia não poderá ser considerada como um único fator indicativo de uma doença específica, uma vez que pode ser influenciada por determinadas substâncias (pesticidas), medicamentos e o próprio câncer podem ser causas de leucopenia. Inúmeros medicamentos tais como antiarrítmicos (propranolol, por exemplo), antibióticos (cloranfenicol, várias penicilinas, gentamicina, cefalosporina, metronidazol), anticonvulsivantes (fenitoína e carbamazepina), antihipertensivos (metildopa e captopril), cortisona, medicamentos usadas no tratamento do diabetes e na doença da tireóide podem levar a diminuição do número total de leucócitos. Sem contar com os medicamentos da quimioterapia e tratamentos radioterápicos. Compreendendo essas interferências sobre os resultados do leucograma, foi que os voluntários da pesquisa que relataram uso de algum desses medicamentos foram excluídos da investigação, considerando apenas a exposição ao pesticida.

A leucopenia encontrada nas análises estão de acordo com o estudo de Albiano *et al.* (1986), em que encontraram leucopenia em 41,7% da população estudada. Essa alteração foi também encontrada no estudo de Carvalho (1988) nos aplicadores de hexaclorociclohexano (pesticida organoclorado conhecido como BHC). Lerda e Masiero (1990) observaram diminuição dos glóbulos brancos em trabalhadores expostos a pesticidas, quando estudaram os efeitos dos mesmos sobre a função reprodutiva. Santos-Filho *et al.* (2005) também puderam constatar leucopenia em trabalhadores expostos a pesticidas organoclorados. Assim quase sempre as leucopenias estão associadas à depressão medular, condição em que há redução de proliferação e maturação das células da medula, podendo no futuro o indivíduo exposto a esses agentes a desenvolver algum tipo de leucemia ou aplasia medular.

Segundo Carvalho (1988), a ação inicial de exposição ao pesticida é de uma leucocitose, indicando uma tentativa de defesa celular importante do organismo agredido. Nas fases subseqüentes, com o aumento a intensidade de exposição, parece que começa haver uma lesão importante no sistema hematopoiético e imune, ocasionando uma leucopenia acentuada. Em nosso estudo, o grupo exposto avaliado apresentou um tempo médio de exposição a esses agentes de 13,5 anos, podendo ser classificado como cronicamente expostos aos pesticidas (glifosato e oaration-metilico) (Quadro 4). Desse modo, esta dentro do período em que é possível ocorrer leucopenia nos indivíduos expostos a pesticidas, como citado por Carvalho (1988). É importante destacar que a diminuição dos leucócitos gera também uma deficiência imunológica, deixando assim o individuo mais vulnerável a doenças oportunistas, que se não tratada pode levar o indivíduo a óbito.

Nos trabalhos realizados por Lerda e Masiero (1990) foi encontrado o aumento significativo de eosinófilos no grupo exposto ao pesticida. A eosinofilia foi detectada em nosso estudo em 40,6% dos indivíduos no grupo exposto em comparação ao grupo controle ($p = 0,018$), foi observado uma diferença significativa, estando de acordo com outros estudos. Porém, esse incremento de eosinófilos pode estar relacionado com a agressão do pesticida ou com a presença de parasito que também pode levar a este aumento (GIGLIO; KALIKS, 2003). Até o momento da nossa investigação, as alterações hematológicas significativas encontradas conduz a uma agressão medular, porém esse aumento no numero de eosinófilos pode estar relacionado as condições de vida da população estudada,

onde pode ser constatado péssimas condições de higiene, bem como seu modo de vida (trabalho sem o uso de calçados apropriados).

Já que o parasitológico de fezes apresentava positividade para verminoses em 81,3% da população investigada. Assim os resultados encontrados podem ser um somatório de parasitose além da possibilidade de da ação tóxica a pesticida, uma vez que a eosinofilia em trabalhadores rurais expostos a pesticidas foi descrita por Giglio e Kaliks (2003).

Os estudos realizados por Carvalho (1988) e Tos-Luty (2004) detectaram a presença de linfocitose, enquanto em nossos resultados não foi evidenciado. Segundo El-Sadek e Hassan (1999) indivíduos expostos a pesticidas apresentam variável mudança hematológica, que incluem desde presença de leucócitos imaturos a um aumento nos glóbulos brancos e na contagem de linfócitos, eventos esses que não foram constatados em nossas investigações. Os linfócitos são células responsáveis pelo controle das células tumorais, através do reconhecimento de seus antígenos expressos, com essa deficiência o organismo não apresenta uma ação eficiente do sistema imune no combate a proliferação e diferenciação dessas células tumorais, proporcionando a instalação e crescimento do câncer. A ausência de linfopenia encontrada deve ser priorizada nas futuras investigações, pois a maioria dos estudos sobre leucemias e linfoma não-Hodgkin mostraram associação positiva com exposição a pesticidas, podendo existir uma relação dose-resposta (Bassil *et al.* 2007). Para Van Maele-Fabry *et al.* (2007) a evidência mais forte de um risco aumentado para leucemia mielóide está nos trabalhadores que fabricam e nos que aplicam de pesticidas.

As transaminases, (TGP ou ALT e TGO ou AST), são enzimas encontradas em vários órgãos e tecidos, incluindo fígado, coração, musculatura esquelética, eritrócitos e outros. A relação TGO/TGP quando inferior a 1 relata hepatites virais agudas, enquanto nas hepatopatias crônicas os valores de TGO permanecem superiores aos de TGP (DOLES, 2008). Nos casos de hepatite aguda ocorrem um aumento muito significativo no sangue dessas enzimas, chegando a ser mais de dez vezes o limite superior do normal e nas agressões crônicas essa alteração, em geral, chegam a ser duas a cinco vezes o limite superior do normal.

A Gama-glutamilttransferase (GGT) é uma enzima microsomal que está amplamente distribuída nos tecidos incluindo o fígado e os túbulos renais. A atividade da GGT no plasma está aumentada sempre que há colestase. Ela mede a

capacidade excretora do fígado. Sua elevação é a alteração laboratorial mais freqüente nas doenças hepatobiliares (mais de 90% dos casos), pois é observada não apenas nas colestases com tradução histológica, mas também nas lesões hepáticas inflamatórias e tóxicas. Dosagens seriadas são imprescindíveis no acompanhamento de agressões hepáticas, para definir a evolução no sentido da cura (SANTOS, 2003).

Segundo a OPAS (1997), a exposição prolongada a múltiplos agrotóxicos afeta diversos órgãos incluindo o fígado, podendo causar hepatite crônica, colecistite e insuficiência hepática. Considerando o tempo de exposição da nossa população estudada e categorizando-a como exposição crônica (média de 13,31 anos), poderíamos inferir a presença de tempo suficiente para que as alterações hepáticas apresentassem-se fora dos valores de referência normais, entretanto em nossos estudos a maioria dos indivíduos apresentava valores enzimáticos dentro dos valores de referência normais (Tabela 20 e 21) sem diferenças significativas. Corroborando com esses achados, Rojas *et al.* (1996) estudando trabalhadores exposto a pesticidas não observou alterações significativas nesses parâmetros hepáticos. Dados esses não observados desde 1969 nos estudos realizados por Tocci *et al.* ao estudar pessoas cronicamente expostas a praguicidas encontrou alterações estatisticamente significativas em Transaminase Glutâmico Pirúvica (TGP) e Fosfatase alcalina indicando alterações hepáticas em trabalhadores expostos. Também, Carvalho (1991) encontrou nos indivíduos expostos ao DDT (pesticida) por mais de 5 anos, alterações significativas de TGO e TGP quando comparado ao grupo controle, sendo que a exposição dos indivíduos dessa pesquisa foi superior em 8,5 anos a mais que a exposição observada neste estudo. E Khan (2006) estudando o efeito do chá preto em animais expostos a pesticidas observou claramente, que esses animais apresentavam extenso dano hepático, e altos níveis de TGO e TGP, demonstrando dessa forma a agressão hepática dos pesticidas.

Segundo Tamburro (1984) a GGT é extremamente sensível para testes de lesão no fígado, assim como os estudos de Carvalho *et al.*, (2006) afirmam que dupla elevação enzimática de GGT + TGP é considerada como um parâmetro sensível e precoce das alterações hepáticas decorrentes de exposições ocupacionais a agentes hepatotóxicos, antes que lesões irreversíveis se desenvolvam.

Nessa pesquisa não foram encontrados valores fora da normalidade entre médias de alterações simultâneas nas enzimas hepáticas TGO e TGP, entre os grupos estudados (Tabela 21). Esse mesmo dado foi encontrado nos estudos de Lerda e Masiero (1990), quando avaliaram a exposição à pesticidas em indivíduos trabalhadores rurais. Apesar de não ter encontrado diferenças significativas nos valores de GGT entre o grupo estudado e controle para ($p < 0,05$) foi observado que houve quase o dobro de indivíduos no grupo exposto aos pesticidas com alteração nos valores de GGT em relação ao grupo controle (75% a mais, sendo 7 indivíduos no grupo exposto X 4 indivíduos do grupo controle).

Quando se avaliou TGO, TGP e GGT, apenas para os indivíduos que apresentaram os valores normais, retirando-se dessa avaliação aqueles que apresentavam valores alterados, foi observado que as médias foram correspondentemente mais elevadas no grupo exposto do que no grupo controle (Tabela 22); a maior diferença foi encontrada nos níveis TGO (23,97 UI/L grupo estudado x 20,14 UI/L grupo controle) ($p = 0,002$), apresentando diferença significativas. Sendo o aumento de TGO considerado forte indicativo de lesões crônicas, enquanto o aumento de TGP sugere lesões agudas, podemos conjecturar que esse aumento significativo no grupo exposto pode indicar uma alteração subclínica estável ou não, que só poderia ser confirmada com acompanhamento médico periódico e possivelmente atestada por biopsia hepática. Para o Hernández *et al.* (2006) o TGO pode ser alterado em exposições a pesticidas dentre eles o glifosato, resultando em uma sutil disfunção hepática que poderá futuramente culminar em citotoxicidade.

Foi observado que em todas as avaliações as médias do grupo exposto (Tabela 21) eram mais elevadas que a do grupo controle, apesar de não apresentar diferenças significativas, resultados semelhantes aos de Brega *et al.* (1998). Porém de acordo com Gomes (2003) estudos que envolvem avaliações das alterações enzimáticas hepáticas vêm demonstrando dificuldades de estabelecimento qualitativo e quantitativo do que seria “alterado”. Uma disfunção bioquímica sutil, resultando em citotoxicidade pode não ser diagnosticada inicialmente como foi observado nos estudos de Tamburro *et al.* (1984), onde foram encontradas lesões hepáticas consistente com exposição química em 37% dos trabalhadores expostos, com teste bioquímico hepático anormal. E entre os trabalhadores expostos, com teste bioquímico sem anormalidade, 23.5% tinham lesões hepáticas consistentes

com a exposição, detectados após biópsia hepática, confirmando que é possível a presença de valores normais e lesão hepática já presente.

Com esse trabalho podemos enfatizar que o uso de métodos não invasivos, de fácil execução e de custo reduzido, são capazes de detectar precocemente agravos a saúde do trabalhador exposto a pesticidas,

6 CONCLUSÃO

Nesse estudo foi identificado o maior uso do pesticida organofosforado (paration-metílico) e o herbicida (glifosato) . Na amostra da população estudada foi possível identificar danos cromossômicos, observados nas alterações numéricas encontradas no Teste de Aberrações Cromossômicas, danos a nível de lesões ao DNA visto pelo Teste Cometa e agressões as células epiteliais da mucosa oral, indicado pela alterações nucleares representadas pela presença de apoptose e necrose identificadas pelo Teste do Micronúcleo. Além disso, foi verificado incidência de anemia e leucopenia, porém ausência de alterações hepáticas. A soma desses fatores poderá levar a desencadeamento dos fenômenos envolvidos na iniciação e promoção do câncer.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGROFIT (Base de dados de produtos agrotóxicos e fitossanitários) 1998. Secretaria de Defesa Agropecuária/ **Ministério da Agricultura e do Abastecimento**. Brasília.

AHAMED M.; ANAND, M.; KUMAR, A.; SIDDIQUI, M.K.J. Childhood aplastic anaemia in Lucknow, India: Incidence, organochlorines in the blood and review of case reports following exposure to pesticides. **Clinical Biochemistry**, v. 39, p. 762-766, 2006.

ALAM MT; CORBEIL M; CHAGNON A; KASATIYA SS. Chromosomal anomalies induced by the organic phosphorus pesticide guthion in chinese hamster cells. **Chromosoma**; v.49, n.1, p.77-86, 1974.

ALAVANJA M. C., BONNER M.R. Pesticidas and human cânceres. **Câncer Invest**, v. 23, p. 700-711. 2005.

ALBIANO, N. F., MATOS, E., UIZICH, R., BUJÁN, E. C. de, LORIA, D, SOBEL, N., DULOUT, F. Efectos sobre la salud por uso prolongado de plaguicidas. Estudio clinico-bioquimico. **Acta bioquim. Clin. Latinoam**, v. 20, n.1, p. 65-72, 1986.

ANDERSON D.; YU T-W; PHILLIPS B. J.; SCHMEZER P. The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical generated DNA damage in human lymphocytes in the Comet assay. **Mutation Research**., v.307, p. 261-271, 1994.

ANGERER J.; EWERS U, WILHELM M. Human biomonitoring: State of the art Int. **J. Hyg. Environ.-Health** v.210, p.201–228, 2007.

ANWAR, W.A. Biomarkers of human exposure to pesticides. **Environ Health Persp**, v. 105, p. 801- 6, 1997.

AUERBACH, C. Forty year of mutation research: a pilgrim's progress. **Heredity**, v. 40, p. 177-187, 1976.

AWA AA. Review of thirty years study of Hiroshima and Nagasaki atomic bomb survivors. II. Biological effects. G. Chromosome aberrations in somatic cells. **J Radiat Res** (Tokyo); v. 16, Suppl., p. 122-31, 1975

AYRES, M.; AYRES Jr., M. A., **BioEstat: Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Médicas**. Manaus: Sociedade Civil Mamirauá/ Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, 1998.

AZMI M. A.; NAQVI S.N.H.; AZMI M. A.; ASLAM, M. Effect of pesticide residues on health and different enzyme levels in the blood of farm workers from Gadap Karachi—Pakistan. **Chemosphere**, v. 64, p.1739–1744, 2006.

BACHS, O.; AGELL, N.; CARAFOLI, E. Calcium and calmodulin function in the cell nucleus. **Biochim. Biophys. Acta.**, v.1113, p. 259-270, 1992.

BARBERINO JL, CARVALHO FM, SILVANY-NETO AM, COTRIM HP, GÓES RC, ROSA H. Alterações hepáticas em trabalhadores de uma refinaria de petróleo e em uma população de referência no estado da Bahia, Brasil. **Rev Panam Salud Pública** , v.17, p.1., p.30-7, 2005.

BASARAN N; SHUBAIR M; UNDEGER U; KARS A Monitoring of DNA damage in foundry and pottery workers exposed to silica by the alkaline comet assay. **Am J Ind Med**; v.43, n.6, p.602-10, 2003.

BHALLI J. A., KHAN Q. M., NASIM A. DNA Damage in Pakistani Pesticide-Manufacturing Workers Assayed Using the Comet Assay. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.47, p.587-593, 2006.

BIGATTI MP; CORONA D; MUNIZZA C. Increased sister chromatid exchange and chromosomal aberration frequencies in psychiatric patients receiving psychopharmacological therapy. **Mutat Res**; v.413, n. 2., p.169-75, 1998.

BILBAN, M. Influence of the work environmental in a Pb-Zn mine on the incidence of cytogenetic damage in miners. **Am. J. Indust. Med.**, v.34, p. 455-463, 1998.

BOLOGNESI C; PERRONE E; LANDINI E Micronucleus monitoring of a floriculturist population from western Liguria, Italy. **Mutagenesis**; v.17, n. 5, p. 391-7, 2002.

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

BOLOGNESI, C., CARRASQUILLA, G., VOLPI, S., SOLOMON, K. R. AND MARSHALL, E. J. P. Biomonitoring of Genotoxic Risk in Agricultural Workers from Five Colombian Regions: Association to Occupational Exposure to Glyphosate. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v.72, n. 15, p.986-997, 2009.

BOLOGNESI, C.; MORASSO, G. Genotoxicity of Pesticides: potencial risk for consumers. **Trends in Food Science & Technology**, v. 11, p. 182-187, 2000.

BONASSI S; NORPPA H; CEPPI M; STRÖMBERG U; VERMEULEN R; ZNAOR A; CEBULSKA-WASILEWSKA A; FABIANOVA E; FUCIC A; GUNDY S; HANSTEEN IL; KNUDSEN LE; LAZUTKA J; ROSSNER P; SRAM RJ; BOFFETTA P. Chromosomal aberration frequency in lymphocytes predicts the risk of cancer: results from a pooled cohort study of 22 358 subjects in 11 countries. **Carcinogenesis**; v.29, n.6, p.1178-83, 2008.

BORÉLLI-GARCIA, P.; MELONI BRUNERI, L.H., OLIVEIRA, A.A.M., MORAES-BARROS, S.B., SILVA, M.M., JUNQUEIRA, V.B.C. e SIMIZU, K. Parâmetros hematológicos na intoxicação experimental pelo hexaclorociclohexano em ratos. **Rev. Farm. Bioquim. Univ. São Paulo**, 22 (1): 51-58, 1986.

BORTOLI G.M.; AZEVEDO MB,SILVA L.B. Cytogenetic biomonitoring of Brazilian workers exposed to pesticides: Micronucleus analysis in buccal epithelial cells of soybean growers. **Mutation Research**, v. 675, p. 1– 4, 2009.

BRAGANÇA-PEREIRA, C. A. “Teste estatístico para comparar proporções em problemas de citogenética”. In: RABELO-GAY, M.N.; RODRIGUES, M.A. R.; MAONTELEONE NETO,R. Mutagênese, carcinogênese e teratogênese: Métodos e critérios de avaliação. São Paulo: Sociedade Brasileira de Genética, 1991.

BRÉGA, S. M., VASSILIEFF, I., ALMEIDA, A., MERCADANTE, A., BISSACOT, D., CURY, P. R., FREIRE-MAIA, D.V. Clinical, cytogenetic and toxicological studies in rural workers exposed to pesticides in Botucatu, São Paulo, Brazil. **Cad. Saúde Pública**, v. 14, n. 3, p. 109-115, 1998.

BULL, S; FLETCHER, K;.BOOBIS, A.R; BATTERSHILL, J.M. Evidence for genotoxicity of pesticides in pesticide applicators: a review. **Mutagenesis**, v. 21, n. 2, p. 93–103, 2006.

BURNS CJ Cancer among pesticide manufacturers and applicators Scand. **J Work Environ Health**; v. 31 Suppl n.1, p. 9-17; discussion 5-7, 2005.

CAKIR S.; SARIKAYA R. Genotoxicity testing of some organophosphate insecticides in the Drosophila wing spot test. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, p. 443–450, 2005.

CANTARUTTI, T. F. P. Risco tóxico de resíduos de pesticidas em alimentos e toxicidade reprodutiva em ratos wistar, Curitiba, 2005. 13º Evento de Iniciação Científica – UFPR.

CARVALHO, F. M., SILVANY NETO, A. M.; MENDES, J. L. B.; COTRIM, H. P.; NASCIMENTO, A. L. C.; LIMA JUNIOR, A. S. CUNHA, T. O. B. Alteração de enzimas hepáticas em trabalhadores de refinaria de petróleo. **Rev. Saúde Publica**; v.40, n.1, p.92-8 2006.

CARVALHO, W. A. DE; LIMA, J. M; BERBERT, P. R; ROCHA, N. V. P. Alterações bioquímicas e hematológicas em indivíduos ocupacionalmente exposto ao hexacloro ciclo hexano e ao DDT / Biochemical and hematological changes in workers exposed to hexachloro cycle hexane and DDT. **Rev. Soc. Bras. Toxicol**; v.1, n, 1/2, p. 60-4, 1988.

CARVALHO, W. A. Fatores de riscos relacionados com exposição ocupacional e ambiental a inseticidas organoclorados no estado da Bahia, Brasil, 1985. **Boletim de la Oficina Sanitária Panamericana**, v.111, n. 6, p. 512-24. 1991.

CELIK, A. E KANIK, A. Genotoxicity ofOccupational Exposure to wood Dust: Micronucleus Frequency and Nuclear Changes in Exfoliated Buccal Mucosa Cells. **Environmental and MolecularMutagenesis**, v. 47, p. 693-698, 2006.

CERQUEIRA, E.M.M., GOMES-FILHO, I.S., TRINDADE, S., LOPES M.A., PASSOS, J.S.,MACHADO-SANTELLI, G.M. Genetic damage in exfoliated cells of

the uterine cervix: Association and interaction between cigarette smoking and progression to malignant transformation? **Acta Cytol.**, v. 42, p. 639-649, 1998.

CERQUEIRA, E.M.M.; GOMES-FILHO, I.S.; TRINDADE, S.; LOPES, M.A.; PASSOS, J.S.; MACHADO-SANTELLI, G.M. Genetic damage in exfoliated cells from oral mucosa of individuals exposed to X-rays during panoramic dental radiographies. **Mutat. Res.**, 562: 111-117, 2004.

CHEREMISINOFF, N.P.; KING, J.A. **Toxic properties of pesticides**. New York: Marcel Dekker, 1994.

CHLEBOVSKY O; PRASLICKA M; HORAK J Chromosome aberrations: increased incidence in bone marrow of continuously irradiated rats. **Science**; v.53, n. 732, p.195-6, 1966.

COHEN MM; MARINELLO MJ; BACK N. Chromosomal damage in human leukocytes induced by lysergic acid diethylamide. **Science**, v.155, n.768, p.1417-9, 1967.

CONGER, A. D.; FAIRCHILD, L. M. A quick freeze method for making smear slides. **Stain. Technol.**, **28**: 281-283, 1953.

COSTA, L.G. Current issues in organophosphate toxicology **Clinica Chimica Acta**, v. 366, p. 1 -13, 2006.

COSTA_C., SILVA S.; COELHO P.; ROMA-TORRES J.; TEIXEIRA J.P.; MAYAN O. Micronucleus analysis in a Portuguese population exposed to pesticides: Preliminary survey. **Int. J. Hyg. Environ.-Health**, v.210, p. 415–418, 2007.

COYE, M.J.; LOWE, I.A.; MADDY, K.T. Biological monitoring agricultural workers exposed to pesticides: I Cholinesterase activity determinators. **J Occup. Med** v.28, p. 619-627, 1986.

CREBELLI, R., CARTA, P., ANDREOLI, C., ARU, G., DOBROWLNY, G., ROSSI, S., ZIJONO, A. Biomanotiring of primary aluminium industry workers: detection of micronuclei and repairable DNA lesions by alkaline SCGE. **Mutat. Res.**, v. 516, p. 63-70, 2002.

CROSSEN PE; MORGAN WF. Cytogenetic studies of pesticide and herbicide sprayers. **N Z Med J**; v.88, n.619, p.192-5, 1978.

DAFFOS, F.; FORESTIER, F; CAPELLA-PAVLOVSKY, Prenatal Management of 746 pregnancies at risk for congenital toxoplasmosis. **N. Engl. J. Med**, v.318, p. 271, 1998.

DAS PP; SHAIK AP; JAMIL K. Genotoxicity induced by pesticide mixtures: in-vitro studies on human peripheral blood lymphocytes. **Toxicol Ind Health**; v.23, n.8, p. 449-58, 2007.

DEL GRANDE, M.; REZENDE, M.O.O. **Distribuição de compostos organoclorados nas águas e sedimentos da bacia do Rio Piracicaba/SP-Brasil.** Química Nova, v.26, p.678-686, 2003.

DEMERS, A., AYOTTE, P., BRISSON, J. DODIN, S., ROBERT, J. & DEWAILLY, E. Risk and aggressiveness of breast cancer in relation to plasma organochlorine concentrations. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v.9, n.2, p. 161-166. 2000.

DOLES REAGENTES; 2008. Disponível em: <http://www.doles.com.br/prods.html>
Acessado em: 3 de Agosto de 2009.

DOLL, D.; PETO, R. The causes of cancer: qualitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. **J. Natl. Cancer Inst.** v.66, p. 1191-1308, 1981.

DÓREA, L. T. M. Danos Cromossômicos e Apoptose em Células Esfoliadas do Epitélio Bucal Associados ao Hábito de Fumar e às Lesões Pré-Malignas e Malignas do Epitélio Oral. 2008. 117p. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Coletiva. Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana- Bahia.

EDWARDS, F. L., TCHOUNWOU, P.B. Environmental Toxicology and Health Effects Associated with Methyl Parathion Exposure – A Scientific Review Int. **J. Environ. Res. Public Health**, v. 2, n. 3, p. 430-441, 2005.

EL-SADEK, W.Y.M; HASSAN, M.H.A. Chronic lymphocytic leukaemia in Egyptian farm workers exposed to pesticide. **La Revue de Santé de la Méditerranée orientale**, v.5, n. 5, p. 960-966, 1999.

ERGENE, S., ÇELIK, A., ÇAVAS, T., KAYA, F. Genotoxic biomonitoring study of population residing in pesticide contaminated regions in Goksu Delta: Micronucleus, chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges. **Environment International**, v. 33, p. 877-885, 2007.

FACHIN, O. **Fundamentos de Metodologia.** 4. ed. São Paulo: Saraiva, 2003

FARIA, N. M.X; FASSA A.G., FACCHINI L.A. Intoxicação por agrotóxicos no Brasil: os sistemas oficiais de informação e desafios para realização de estudos epidemiológicos. **Ciência e Saúde Coletiva**, v.12, n. 1, p. 25-38, 2007.

FARIAS N.M.X. ROSAI, J.Á.R., FACCHINI, L. A. Intoxicações por agrotóxicos entre trabalhadores rurais de fruticultura, Bento Gonçalves, RS **Rev Saúde Pública**; v. 43, n. 2, p. 335-44, 2009.

FAUST F., KASSIE F., KNASMULLER S., BOEDECKER R.H., MANN M., MERSCH-SUNDERMANN V. The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies. **Mutation research**, v.566, p. 209-229, 2004.

FENECH M., CHANG, W.P., KIRSCH-VOLDERS, M., HOLLAND N., BONASSI, S., ZEIGER, E. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the

cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures **Mutation Research** v. 534, p. 65–75, 2003.

FENECH, M. The role of folic acid and Vitamin B12 in genomic stability of human cells. **Mutat. Res.**, vol. 475(1-2), p. 57-67, 2001.

FENG S; KONG Z; WANG X; PENG P; ZENG EY Assessing the genotoxicity of imidacloprid and RH-5849 in human peripheral blood lymphocytes in vitro with comet assay and cytogenetic tests. **Ecotoxicol Environ Saf**; v. 61, n. 2, p. 239-46, 2005.

FERNÍCOLA, N.A.G.G. Toxicologia de los insecticidas organoclorados. **Boletim Santel Panama**, v.98, p.1-6, 1985.

FERREIRA, K. S.; GOMES, J. C.; BELLATO, C R; JORDÃO, C. P. Concentrações de selênio em alimentos consumidos no Brasil/ Selenium content of Brazilian foods. **Rev Panam Salud Publica** v.11, n. 3, p.172-177, 2002.

FEULGEN, R.; ROSSENBECK, H. Mikroskopisch chemischer Nachweis einer Nucleinsäure vom Typus dre thymonucleinsäure und die daralf bestehende elektive farbung von Zellkernen in mikroskopischen Präparate. **Z. Fisiol. Chen.**, v. 135, p. 203-48, 1924.

FLECK, J. Câncer: integração clínico biológica. Rio de Janeiro; **Médica e Científica**, 1992.

FORGET G. Pesticides: necessary but dangerous poison s. **International Development Research Center Report**, v. 18, p. 4-5,1989.

FORGET G., GOODMAN T., de VILLIERS A. Impact of pesticide use on health in developing countries. **International Development Research Center**, 1993.

FREITAS, V.S.; LOPES, M. A. ; MEIRELES, JRC ; CARVALHO, L. R. ; CERQUEIRA, E. M. M. Efeitos Genotóxicos de fatores considerados de risco para o câncer bucal. **Revista Baiana de Medicina e Saúde Pública**, vol.29, n.2, p.189-199, 2005.

FUNDAÇÃO IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e estatística; Censo Demográfico 2000. < www.ibge.gov.br > Acessado em 15/09/2009

GAMLIN J; DIAZ ROMO P; HESKETH T Exposure of young children working on Mexican tobacco plantations to organophosphorous and carbamic pesticides, indicated by cholinesterase depression. **Child Care Health Dev**; v.33, n. 3, p. :246-8, 2007

GARAJ-VRHOVAC, V.; ZELJEZIC, D. 2001. Cytogenetic monitoring of Croatian population occupationally exposed to a complex mixture of pesticides. **Toxicology**, v. 165, p.153-162, 2001.

_____. Evaluation of DNA damage in workers occupationally exposed to pesticides using single-cell gel electrophoresis (SCGE) assay : pesticides genotoxicity revealed by comet assay. **Mutation Research**, v. 469, p. 87-95., 2000.

_____. Assessment of Genome Damage in a Population of Croatian Workers Employed in Pesticide Production by Chromosomal Aberration Analysis, Micronucleus Assay and Comet Assay. **Journal Of Applied Toxicology**, v. 22, p.249–255, 2002.

GEBHART, E. The treatment of human chromosome in vitro: results. In: Vogel, F. Rohrdorn, G. (eds) Chemical mutagenesis in mammals and man. **Pringer**, p. 367-382, 1970.

GEORGE KA; HADA M; JACKSON LJ; ELLIOTT T; KAWATA T; PLUTH JM; CUCINOTTA FA Dose response of gamma rays and iron nuclei for induction of chromosomal aberrations in normal and repair-deficient cell lines **Radiat Res**; v.171, n. 6, p.752-63, 2009.

GIGLIO, A. D.; KALIKS, R.; **Princípio de hematolgia clinica**. São Paulo: Manole, 2007.

GOMES, A. **Prevalência de alterações dos testes enzimáticos hepáticos em trabalhadores de indústria de petróleo**. Dissertação (Mestrado em Saúde Coletiva). Núcleo de Estudos de Saúde Coletiva, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2003

GONÇALVES, R. O., MELO, N. A., CARVALHO, F.M. GÓES R. C. Efeitos genotóxicos e alterações de enzimas hepáticas em trabalhadores do refino de petróleo **J Bras Patol Med Lab**, v. 41, n. 5. p. 297-9, 2005.

GONTIJO, A. M. M. C.. Teste do cometa para detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. In: **Mutagênese Ambiental**. Rio Grande do Sul: Editora da ULBRA, p. 247-279, 2003.

GONZALEZ, C. M.; LORIA,D.; MATOS, E.Genotoxicity of the pesticide propoxur and its nitroso derivative, no-propoxur, on human lymphocytes in vitro. *Mutat. Res.*; v.232, n.1, p. 45-49, 1990.

GROVER P; SINGH SP; PRABHAKAR PV; REDDY UA; BALASUBRAMANYAM A; MAHBOOB M; RAHMAN MF; MISRA S In vivo assessment of genotoxic effects of Annona squamosa seed extract in rats **Food Chem Toxicol**; v.47, n.8, p.1964-71, 2009.

GURGEL, I. G. D. **Repercussão dos agrotóxicos na saúde dos Agentes de Saúde Pública em Pernambuco**. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Saúde Coletiva – NESC/CPqAM/FIOCRUZ/MS, 1998.

GÜVEN, G. S., GÜVEN, M., ONARAN, I., ULUTIN, T., HACIHANEFIOGLU, S. Individual sensitivity to cytogenetic effects of benzo[]pyrene in cultured human

lymphocytes: Influence of glutathione S-transferase M1 genotype **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n.1, p.142-147, 2006.

HALLARE A. V.; GERVASIO, M. K. R.. GERVASIO P. L. G., ACACIO-CLARO P. J. B Monitoring genotoxicity among gasoline station attendants and traffic enforcers in the City of Manila using the micronucleus assay with exfoliated epithelial cells **Environ Monit Assess**, v.156, p. 331–341, 2009.

HARTMANN A; PLAPPERT U; RADDATZ K; GRÜNERT-FUCHS M; SPEIT G. Does physical activity induce DNA damage? **Mutagenesis**; v.9, n.3, p.269-72, 1994.

HE, J. L.; CHEN, W. L.; JIN, L. F.; JIN, H. Y. Comparative evaluation of the in vitro micronucleus test and the comet assay for the detection of genotoxic effects of X-ray radiation. **Mutation Research**, n. 469, p. 223-231, 2000.

HEDDLE, J.A. HITE, M., KIRKHART, B., MAVOURRININ, K., MCGREGOR, J. T., NEWELL, G.W., SALAMONE, M. F. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U. S. environmental protection Agency Gen-Tox Program. **Mutation Research**, v.123, p. 61-118, 1983.

HEEPCHANTREE, W., PARATASILPIN T., KANGWANPONG D., A comparative biomonitoring study of populations residing in regions with low and high risk of lung cancer using the chromosome aberration and the micronucleus tests. **Mutation research**, v.587, p. 134-139, 2005.

HENAO SH, COREY GO. **Plaguicidas organofosforados y carbamicos**. México: Organização PanAmericana de Saúde (Centro Pan-Americano de Ecologia Humana e Saúde); 1987.

HERNÁNDEZ AF; AMPARO GÓMEZ M; PÉREZ V; GARCÍA-LARIO JV; PENA G; GIL F; LÓPEZ O; RODRIGO L; PINO G; PLA A Influence of exposure to pesticides on serum components and enzyme activities of cytotoxicity among intensive agriculture farmers. **Environ Res**; v.102, n.1, p. 70-6, 2006.

HOLECKOVÁ B; SIVIKOVÁ K; DIANOVSKY J Effect of N-methylcarbamate pesticide bendiocarb on cattle lymphocytes after in vitro exposure **Acta Biol Hung**; v. 60, n. 2, p.167-75, 2009.

HOLLAND N., BOLOGNESI C., KIRSCH-VOLDERS M., BONASSI S. ZEIGER E., KNASMUELLER S., FENECH M. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: The HUMN project perspective on current status and knowledge gaps **Mutation Research**, v.659, p.93–108, 2008.

HOLMQUIST, G. P.; MOTARA, M. A. the magic of cytogenetic technology. In: Obe g, Basler A, eds. Cytogenetics. Berlin: **Springer – verlag**: p. 30-47, 1987.

IARC, 2007. Cancer Incidence in five continents vol. IX, IARC PUBLICATIONS

IARMARCOVAI, G., BONASSI, S., SARI-MINODIER, I., BACIUCHKA-PALMARO, M., BOTTA, A. AND ORSIE`RE, T. Exposure to genotoxic agents, host factors and

lifestyle influence the number of centromeric signals in micronuclei: a pooled re-analysis. **Mutat. Res.**, v.615, p.18–27, 2007.

IBGE. **Uso de Agrotóxicos no estado do Paraná: safra 1998/1999. Tabelas selecionadas.** Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/agrotoxicos.shtm>>. Acessado em: 10 jan 2006

ILO – International Labour Organization; Hurst, P.; Kirby, P.; Health, Safety and Environment: A Series of Trade Union Education Manuals for Agricultural Workers; 2004; Disponível em: <http://www.ilo.org/>. Acessado em: 4 de outubro de 2008.

INCA – Instituto Nacional do Câncer- Nova rede incrementa pesquisa e controle do câncer hereditário. Revista Rede câncer n. 02, p.24- 25, 2007.

INCA – Instituto Nacional do Câncer. Ministério da Saúde (2000). Disponível no site: <http://www.inca.org.br>. Acessado em 25 de maio de 2009.

JAGA K; DHARMANI C. The epidemiology of pesticide exposure and cancer: A review. **Rev Environ Health**; v. 20, n. 1, p. 15-38, 2005.

JENSSEN, D.; RAMEL, C. The micronucleus test as part of a short-term mutagenicity test program for the prediction of carcinogenicity evaluated by 143 agents tested. **Mutation Research**, v. 75, p. 191-202, 1980.

JOKSIC G.; VIDA KOVIC A.; SPASOJEVIC-TISMA V. Cytogenetic monitoring of pesticides sprayers. **Environ Res**, v. 75, p. 113-8, 1997.

KALBFLEISCH, S. G. **Probability and statistical inference.** v.1 e 2, New York, Springer-Verlag, 1979.

KEHDY, F.S.G., CERQUEIRA, E.M.M., BONJARDIN, M.B., CAMELO, R.M., CASTRO, M.C.L. Study of the cytogenetic effects of occupational exposure to pesticides on sanitation workers in Belo Horizonte, Brasil. **Genetics and Molecular Research**, v.6, n. 3, p. 581-593, 2007.

KHAN S. M. Protective effect of black tea extract on the levels of lipid peroxidation and antioxidant enzymes in liver of mice with pesticide-induced liver injury. **Cell Biochem Funct**, v.24, p. 327–332, 2006.

KIRKLAND D; AARDEMA M; HENDERSON L; MÜLLER L Evaluation of the ability of a battery of three in vitro genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens I. Sensitivity, specificity and relative predictivity. **Mutat Res**; v. 584, n. 1-2, p. 1-256, 2005.

KISBY GE; MUNIZ JF; SCHERER J; LASAREV MR; KOSHY M; KOW YW; MCCAULEY L Oxidative stress and DNA damage in agricultural workers **J Agromedicine**; v.14, n. 2, p. 206-14, 2009.

KLASSEN, C. D. **Toxicology**: the basic science of poisons. 6th. ed. New York: Mc Graw- Hill, 2001

KLAUDE, M., ERIKSSON, S., NYGREN, J., AHNSTROM, G. The comet assay: mechanisms_and_technical considerations. **Mutation Research**, v.363, p. 89-96, 1996.

KNUDSEN L E; HANSEN A M. Biomarkers of intermediate endpoints in environmental and occupational Health. **Int J Hyg Environ Health**; v.210, n 3-4, p. 461-70, 2007.

KOLAJA, K. L.; STEVENSON, D. E.; WALBORG, E. F. Jr.; KLAUNIG, J. E. Selective dieldrin promotion of hepatic focal lesions in mice. **Carcinogenesis**, v.17, n. 6, p. 1243-1250, 1996.

KRISHNA G; XU J; NATH J; PETERSEN M; ONG T. In vivo cytogenetic studies on mice exposed to ethylene dibromide. **Mutat Res**; v.158, n.1-2, p. 81-7, 1985.

KUCEROVA, M.; BIANCHI M; BIANCHI NO; BREWEN JG; BUCKTON KE; FABRY L; FISCHER P; GOOCH PC;; LÉONARD A; MUKHERJEE RN; MUKHERJEE U; NAKAI S; NATARAJAN AT; OBE G; PALITTI F; POHL-RÜLING J; SCHWARZACHER HG; SCOTT D; SHARMA T; TAKAHASHI E; TANZARELLA C; VAN BUUL PP. Evaluation of radiation-induced chromosomal aberrations in human peripheral blood lymphocytes in vitro: result of an IAEA-coordinated programme. **Mutat Res**; v. 96, n. 2-3, p.233-42, 1982.

KULLER, J. A.; CHESCHEIR, N. C.; CEFALO, R. C., Prenatal diagnosis and reproductive genetics. Mosby – Year Book Inc, 15, 1996.

LAFIURA K. M.,BIELAWSKI D. M., POSECION JR N. C., OSTREA JR.E.M., MATHERLY L.H., TAUB J.W., GE Y. Association Between Prenatal Pesticide Exposures and the Generation of Leukemia-Associated T(8;21). **Pediatr Blood Cancer** ; v.49, p.624–628, 2007.

LAW S; BASU K; BANERJEE S; BEGUM B; CHAUDHURI S. Cord blood-derived plasma factor (CBPF) potentiates the low cytokinetic and immunokinetic profile of bone marrow cells in pesticide victims suffering from Acquired Aplastic Anaemia (AAA): an in vitro correlate. **Immunol Invest**; v.35, n.2, p. 209-25, 2006.

LEITE, K. C. TORRES M. B. R. O uso de agrotóxicos pelos trabalhadores rurais do assentamento Catingueira Baraúna – RN; **Revista verde de agroecologia e desenvolvimento sustentável**. Grupo verde de agricultura alternativa (GVAA); v.3, n.4, p. 06-28 , 2008.

LERDA, D.E.; MASIERO, B. Estudio citogenético, bioquímico y de la función reproductivas em personas expuestas a plaguicidas. **Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana**, v. 24, n. 3, p. 247-255, 1990.

LIU SH; CHEN YH; LOH CH; YANG T; WU TN; CHEN CJ; HSIEH LL The association between frequencies of mitomycin C-induced sister chromatid exchange and cancer risk in arseniasis. **Toxicol Lett**; v.129, n. 3, p. 237-43, 2002.

LOVELL, D. P.; THOMAS, G.; DUBOW, R. Issues related to the experimental design and subsequent statistical analysis of in vivo and in vitro comet studies. **Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis**, v. 19, n. 109-119, 1999.

LUBS, H. A., SAMUELSON, J. chromosome abnormalities in lymphocytes from normal human subjects. *Cytogenetics*, v. 6, p. 402-411, 1967.

LUCERO, S. PASTOR,S., S. SUAREZ, S., DURBAN,R., GOMEZ, C., PARRON,P., CREUS, A., MARCOS, R. Cytogenetic biomonitoring of Spanish greenhouse workers exposed to pesticides: micronuclei analysis in peripheral blood lymphocytes and buccal epithelial cells, *Mutat. Res.* v. 464, p. 255–262, 2000.

LUNA, A. J.; SALES, L. T.; SILVA, R. F. **Agrotóxicos**: responsabilidade de todos: uma abordagem da questão dentro do paradigma do desenvolvimento sustentável. Disponível em: <http://www.prt6.gov.br/forum/downloads/Artigo1_Adeilson.doc>. Acesso em: 4 out 2009

MACHADO-SANTELLI, G. M.; CERQUEIRA, E.M.M.; OLIVEIRA, C. T.; BRANGRAÇA-PEREIRA, C.A.B. Biomonitoring of nurses handling antineoplastic drugs, **Mutat Res.**, v.322, p.203-8, 1994.

MARCONI, M. A.; LAKATO, E. M. **Fundamentos de Metodologia Científica**, 6ª edição, São Paulo, Atlas, 2005.

MARCZYNSKI, B., RIHS, H.P., ROSSBACH, B., HOLZER, J., ANGERER, J., SCHERENBERG, M., HOFFMANN, G., BRUNING, T., WILHELM, M. Analysis of 8-oxo-7,8-dihydro-2-deoxyguanosine and DNA strand breaks in white blood cells of occupationally exposed workers: comparison with ambient monitoring urinary metabolites and enzyme polymorphisms. **Carcinogenesis**, v.23, p. 273-281, 2002.

MARLHENS F; ACHKAR WA; AURIAS A; COUTURIER J; DUTRILLAUX AM; GERBAULT-SEREAU M; HOFFSCHIR F; LAMOLIATTE E; LEFRANÇOIS D; LOMBARD M. The rate of chromosome breakage is age dependent in lymphocytes of adult controls. **Hum Genet.**, v. 73, p. 290-297, 1986.

MARTINELLI, O. J. **Agroquímicos**: relatório setorial preliminar. Porto Alegre, 2003. 46p. Relatório Técnico DPP. Disponível em: <http://www.finep.gov.br/PortalDPP/relatorio_setorial/impressao_relatorio.asp?lst_setor=24>. Acesso em: 4 out. 2008.

MARTINO-ROTH M.G., VIÉGAS, J., AMARAL, M., OLIVEIRA, O., FERREIRA, F.L.S., ERDTMANN, B. Evaluation of genotoxicity through micronuclei test in workers of car and battery repair garages. **Genetics and Molecular Biology**, v. 25, n. 4, p. 495-500, 2002.

MARTINS R.A., GUILHERME A., GOMES GA da S., AGUIAR JR, O., RIBEIRO D. A. Biomonitoring of oral epithelial cells in petrol station attendants: Comparison between buccal mucosa and lateral border of the tongue. **Environment International** v. 35, p.1062–1065, 2009.

MATTEI, M. G., AYME,S., MATTEI, J.F., AURRAN, Y., GIRAUD, F. Distribution of spontaneous chromosome breaks in man. **Cytogenet Cell Genet.**, v. 23, p. 95-102, 1979.

MCCAULEY LA; LASAREV M; MUNIZ J; NAZAR STEWART V; Analysis of pesticide exposure and DNA damage in immigrant farmworkers. **J Agromedicine**; v.13, n.4, p.237-46, 2008.

MCCAULEY, L. A.; ANGER, W. K.; KEIFER, M.; LANGLEY, R.; ROBSON, M. G.; ROHLMAN, D.; Studying Health Outcomes in Farmworker Populations Exposed to Pesticides; **Environmental Health Perspectives**, v. 114, n. 6, 2006.

MCKELVEY-MARTIN VJ; GREEN MH; SCHMEZER P; POOL-ZOBEL BL; DE MÉO MP; COLLINS A The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European review ; v. 288, n. 1, p. 47-63, 1993.

MERK O; SPEIT G. Detection of crosslinks with the comet assay in relationship to genotoxicity and cytotoxicity. **Environ Mol Mutagen**; v. 33, n.2, p.167-72, 1999.

MILACIC S Risk of occupational radiation-induced cataract in medical workers. **Med Lav**; v.100,n.3, p.178-86, 2009.

MIYAMAE, Y., YAMAMOTO, M., SASAKI, Y.F., KOBAYASHI, H., IAGARASHI-SOGA, M., SHIMOI, K., HAYASHI, M. Evaluation of a tissue homogenization technique that isolates nuclei for the in vivo single cell gel electrophoresis (comet) assay: a collaborative study by five laboratories. **Mutation Research**, v. 418, p. 131-140, 1998.

MOOREHEAD, P.S. *et al.* Chromosomal Cell Culture. Exp. **Cell Res.**, v.145, p. 613-616, 1960.

MOREIRA J.C. *et al.* Avaliação integrada do impacto do uso de agrotóxicos sobre a saúde humana em uma comunidade agrícola de Nova Friburgo, RJ. **Rev. Ciência e Saúde Coletiva** v.7, n. 2, p. 299-311, 2002.

MINISTERIO DA SAUDE (MS)- Protocolo de atenção á saúde dos trabalhadores expostos a agrotóxicos. Agosto, 2006.

MUNIZ J.F., MCCAULEY L., SCHERER J., LASAREV M., KOSHY M., KOW Y.W., NAZAR-STEWARD V., KISBY G.E. Biomarkers of oxidative stress and DNA damage in agricultural workers: A pilot study. **Toxicology and Applied Pharmacology** , v.227, p. 97–107, 2008.

NADLER CF; HUGHES CE Chromosomal aberrations in a population of ground squirrels. **Science**, v.151, n. 710, p.579-80, 1966.

NICOLS, D.M.; KULISZEWSKI, M.J. Kidney urokinase activity following acute exposure to lead. **Biochem. Pharmacol.**, v. 33, n. 2, p. 181-187, 1984.

NUNES, M.V.; TAJARA, E. H. Efeitos tardios dos praguicidas organoclorados no homem. **Rev. Saúde Pública**, v.32, n.4, p.372-382, 1998.

OLIVE, P. L.; BANÁTH, J. P.; DURAND, R. E. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumour and normal cells measured using the "comet" assay. **Radiat. Res.**, v.122, p.69-72, 1990.

OLIVE, P.L. Cell proliferation as a requirement for development of the contact effect in Chinese hamster V79 spheroids. **Radiat Res.**, v. 117, p. 79-92, 1989.

OLIVEIRA-SILVA J.J, ALVES SR, MEYER A, PEREZ F, SARCINELLI P.N, MATTOS R.C.O.I. Influência de fatores socioeconômicos na contaminação por agrotóxicos, Brasil. **Rev Saude Publica**, v. 35, n. 2, p. 130-5, 2001.

OLIVEIRA-SILVA JJ, MEYER A, MOREIRA, JC. Cholinesterase activities determination in frozen blood samples: an improvement to the occupational monitoring in developing countries. **Human and Environmental Toxicology**, v.19, p. 173-177, 2000.

OPAS - Organização Pan-Americana da Saúde; Manual de vigilância da saúde de populações expostas a agrotóxicos; Brasília;1997.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **Métodos utilizados para estabelecer níveis admisíveis de exposição profissional a los agentes nocivos**. Ginebra, 1977. 74 p. (Série de Informes Técnicos, 601).

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS) 1990. **Life tables**. Disponível: http://apps.who.int/whosis/database/life_tables/life_tables_process.cfm?path=whosis_life_tables&language=english. Acessado: 12 de agosto 2007.

OSTLING, O.; JOHANSON, K. J. Bleomicine, in contrast to gamma irradiation, induces extreme variation of DNA strand breakage from cell to cell. **Int. J. Radiat. Biol.**, v.52, p. 683-691, 1987.

OSTLING, O.; JOHANSON, K. J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 123, p. 291-298, 1984.

PACHECO, A. O.; HACKEL, C. Instabilidade cromossômica induzida por agroquímicos em trabalhadores rurais na região de Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, v.18, n.6, p.1675-1683, 2002.

PARANÁ. Secretaria de Estado de Saúde do Paraná. Toxicológico – principal, 1997. Disponível em: <<http://www.saude.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=484>>. Acesso em: 10 maio de 2008.

PASTOR S; CREUS A; XAMENA N; SIFFEL C; MARCOS R Occupational exposure to pesticides and cytogenetic damage: results of a Hungarian population study using the micronucleus assay in lymphocytes and buccal cells. **Environ Mol Mutagen**; v. 40, n. 2, p. 101-9, 2002.

PASTOR, S., CREUS, A., PARRON, T., CEBULSKA-WASILEWSKA, A., SIFFEL, C., PIPERAKIS, S. AND MARCOS, R. Biomonitoring of four European populations occupationally exposed to pesticides: use of micronuclei as biomarkers. **Mutagenesis**, v.18, p. 249–258. 2003.

PASTOR, S., GUTIÉRREZ, S., CREUS, A., CEBULSKA-WASILEWSKA, A. MARCOS, R. 2001. Micronuclei in peripheral blood lymphocytes and buccal epithelial cells of polish farmers exposed to pesticides. **Mutation Research**, v.495, p. 147-156, 2001.

PATEL S; PANDEY AK; BAJPAYEE M; PARMAR D; DHAWAN A. Cypermethrin-induced DNA damage in organs and tissues of the mouse: evidence from the comet assay **Mutat Res**; v.607, n. 2., p.176-83, 2006.

PERERA, F. P. Environment and câncer: Who are susceptible? **Science**, v. 278, p. 1068-1071, 1997.

PERES F. É veneno ou é remédio? Os desafios da comunicação rural sobre agrotóxicos. Dissertação de mestrado. Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 1999.

PERES, F.; Oliveira-Silva, J. J.; Della-Rosa, H. V. Lucca, S. R.; Desafios ao estudo da contaminação humana e ambiental por agrotóxicos; **Cad Saúde Pública**. v.21, n.6., p. 1836-44, 2005.

PIMENTEL D. Green revolution agriculture and chemical hazards. **The Science of the Total Environment**, v. 188, n. 1, p. S86-S98, 1996.

PINCU, M.; BASS, D.; NORMAN, A. An improved micronuclear assay in lymphocytes. **Mutation Res**. v.139, p. 61-65, 1984.

PIRTSKHELANI AG; PIRTSKHELANI NA; GAKHOKIDZE RA; BICHIKASHVILI NV; KALANDIIA EA The influence of polyvitamin complex polijen on mutagenic and cytotoxic effect of copper oxychloride in white mice **Georgian Med News**; v.159, p. 44-7, 2008.

POTT, P. Cirurgical observations relative to cancer of the scrotum. In: Classics in oncology. **New York: American Cancer Society**, p 9-17. 1987.

PRABHAVATHY D. G; PASHA S. A; JAMIL K Cytotoxicity and genotoxicity induced by the pesticide profenofos on cultured human peripheral blood lymphocytes **Drug Chem Toxicol**; v.29, n.3, p. 313-22, 2006.

RABELO-GAY, M. N. RODRIGUEZ, M. A. L. R. & MONTELEONE-NETO, R. Mutagêneses, Carcinogêneses e Teratogêneses. Métodos e Critérios de Avaliação. **Revista Brasileira de Genética**, 1991.

RAMIREZ O; ABARCA M Frequencies of chromosomal aberrations in rodents of the Rimac Valley-Perú. **Biol Res.**, v. 26, n. 3, p.331-5, 1993.

RAMÍREZ, A. ; SALDANHA, P.H. Micronucleus investigation of alcoholic patients with oral carcinomas. **Genet Mol Res.**, v. 1, p. 246-260, 2002.

RAMOS, A.; SILVA FILHO, J. F.; Exposição a pesticidas, atividade laborativa e agravos à saúde. **Rev Med Minas Gerais**; v.14, n. 1., p. 41-5; 2004.

RATNER D., OREN B, VIGDERK. Chronic dietary anticholinesterase poisoning. **Isr J Med Sci**, v.19, p. 810-4, 1983.

RAY, M. R., BASU,C., MUKHERERJEE, S., ROYCHOWDHURY, S., LAHIRI, T. Micronucleus frequencies and nuclear anomalies in exfoliated buccal epithelial cells of firefihnters. **International Journal of Muman Genetics**, v.5, p. 45-48, 2005.

REGAN, L. ; RAÍ, R. Epidemiology and the medical causes of miscarriage. **Res Clin Obstet Gynaecol.**, v. 14, n. 5, p. 839-54, 2000

REIS, S. R. A. ; SADIGURSKY, M; ANDRADE, M G S; SOARES, L P; ESPÍRITO SANTO, A RRO DO; VILAS BÔAS, D S. Efeito Genotóxico do Etanol em células esfoliadas da mucosa bucal. **Pesqui. Odontol.Bras.**, São Paulo, v.16, n.3, 221-225p, 2002.

REIS, S. R. A. ; SOARES, L P; ROCHA, D; SETÚBAL, M G.. Avaliação da presença de micronúcleos em células esfoliadas da língua de indivíduos dependentes químicos de etanol através dos métodos de Feulgen e Papanicolau. **Rev. odonto ciênc**; v. 19, n. 46, p. 367-371, 2004.

REMOR, A. P.; TOTTI, C. C.; MOREIRA, D. A.; DUTRA, G. P. P.; HEUSER, V. D.; BOEIRA J. M. Occupational exposure of farm workers to pesticides: Biochemical parameters and evaluation of genotoxicity. **Environ. Int.**, v. 35, n. 2, p. 273-278, 2009.

RIBEIRO, A.C.C; MELLA, E.A.C. Intoxicação ocupacional por organofosforados – A importância da dosagem de colinesterase; **Iniciação Científica CESUMAR**; v. 09, n.02, p. 125-134; 2007.

RIBEIRO, F. S. N.; MENDONÇA, G. A. E. S.; REIS, M.; BRITO, P. F.; BARRETO, S. R.; OTERO, T. B. **Vigilância do Câncer relacionado ao trabalho e ao ambiente**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

ROJAS, M., RIVERI, E., SOUZA, L de Estúdio de los efectos tóxicos de los insecticidas organofosforados em pilotos agrícolas y mezcladores. **Gac. Méd. Caracas**, v.104, n.1, p. 56-62, 1996.

ROSIN M.P. The use of the micronucleus test on exfoliated cells to identify anticlastogenic action in humans: a biological marker for the efficacy of chemopreventive agents, **Mutat. Res.**, v.267, p.265–276, 1992.

ROSSI AM; HANSTEEN IL; SKJELBRED CF; BALLARDIN M; MAGGINI V; MURGIA E; TOMEI A; VIARENGO P; KNUDSEN LE; BARALE R; NORPPA H; BONASSI S. Association between frequency of chromosomal aberrations and cancer risk is not influenced by genetic polymorphisms in GSTM1 and GSTT1. **Environ Health Perspect**; v. 117, n. 2, p. 203-8, 2009.

SAILAJA N., CHANDRASEKHAR M., REKHADEVI P. V., MAHBOOBA M., RAHMANA M.F., VUYYURI S.B., DANADEVI K., HUSSAIN S.A., GROVER P. Genotoxic evaluation of workers employed in pesticide production. **Mutation Research** v. 609, p. 74–80 2006.

SALVATORE AL; BRADMAN A; CASTORINA R; CAMACHO J; LÓPEZ J; BARR DB; SNYDER J; JEWELL NP; ESKENAZI B. Occupational behaviors and farmworkers' pesticide exposure: findings from a study in Monterey County, California **Am J Ind Med**; v. 51, n.10, p.782-94, 2008.

SANTOS, M. M. A; **Provas de função e lesão hepática, 2003**. Disponível em: <http://www.damedpel.com/CDD/5o_6oAno/CLINICA/Internato%20I/Discussao%20-%20Dr.%20Gastal/DD.REVIS%C3O%20%20%20Prova_funcao_hepatica%20Med_students%2B%2B%2B.pdf>. Acesso em: 10 maio 2008.

SANTOS, N. N. A. **Danos citogenéticos e citológicos em indivíduos sob diferentes formas de exposição a mutágenos, avaliados pelo Teste de Micronúcleo (MN)**. Tese (Doutorado) – Departamento de Práticas de Saúde, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

SANTOS-FILHO, E., SILVA, R.S., LEMOS, V.R.R., BARRETO, H.H.C., IOMATA, O.N.K., KUSSUMI, T. A., ROCHA, S.O.B. Alterações clínicas e laboratoriais relacionadas exposição ambiental aos praguicidas organoclorados em moradores de aterro a céu aberto em cubatão S.P. **Revista Inst. Adolfo Lutz**, v.64, n.1, p. 70-8, 2005.

SARTO,F., FINOTTO, S., GIACOMELLI, L., MAZZOTI, D., TOMANIN, R., LEVIS, ^a G. The micronucleus assay in exfoliated cells of the human buccal mucosa. **Mutagenesis**, v.2, p.11-7, 1987.

SCHIMID, W. In: Hollaender, A. Chemical Mutagens: Principles and Methods for their Detection, v. 4, p. 31-43, Plenum, New York, 1976.

SCHMID, W The micronucleus test. **Mutat Research**, 3: 175-180, 1975.

SCHWARTZ JL; MUSCAT JE; BAKER V; LARIOS E; STEPHENSON GD; GUO W; XIE T; GU X; CHUNG FL. Oral cytology assessment by flow cytometry of DNA adducts, aneuploidy, proliferation and apoptosis shows differences between smokers and non-smokers. **Oral Oncol.**; v.39, n. 8, p. 842-54, 2003.

SCOTT D; EVANS HJ X-ray-induced chromosomal aberrations in vicia faba: changes in response during the cell cycle **Mutat Res.**; v.4, n.5, p.579-99, 1967.

SEILER JP Nitrosation in vitro and in vivo by sodium nitrite, and mutagenicity of nitrogenous pesticides. **Mutat Res.**; v.48, n.2, p.225-36, 1977.

SHARP, D.S. *et al.* Delayed health hazards of pesticide exposure. **Ann. Rev. Public Health**, v. 7, p. 441-71, 1986.

SHERLOCK, S.; DOOLEY, J. **Doenças do fígado e do sistema biliar**; 11ª edição; Guanabara, 2004.

SILVA J DA; MORAES CR; HEUSER VD; ANDRADE VM; SILVA FR; KVITKO K; EMMEL V; ROHR P; BORDIN DL; ANDREAZZA AC; SALVADOR M; HENRIQUES JA; ERDTMANN B Evaluation of genetic damage in a Brazilian population occupationally exposed to pesticides and its correlation with polymorphisms in metabolizing genes **Mutagenesis**; v. 23, n. 5, p. 415-22, 2008.

SILVA, A. S.; RIEDER, A; DORES, E. F. G. C.; RODRIGUES, G. L.; MENDES, M. F.; SILVA, P. L.; LACERDA, R. G. HACON, S. **Agentes pesticidas causadores de intoxicação em três zonas habitacionais do Município de Cáceres, Alto Pantanal, MT, Brasil.** In: SIMPÓSIO SOBRE RECURSOS NATURAIS E SÓCIO-ECONÔMICAS DO PANTANAL, 4., Corumbá/MS, 2004.

SIMONIELLO MF; KLEINSORGE EC; SCAGNETTI JA; GRIGOLATO RA; POLETTA GL; CARBALLO MA. DNA damage in workers occupationally exposed to pesticide mixtures. ; **J Appl Toxicol**, v.28, n.8, p.957-65, 2008

SINDICATO NACIONAL DAS INDÚSTRIAS DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS (SINDAG). **Estimativa de mercado.** Disponível em: <<http://www.sindag.com.br>>. Acesso em: 19 out 2009

SINGH, M. P.; McCOY, M. T; TICE, R. R.; SCHNEIDER P. A simple technique for quantitation of low levels of DNA in individual cells. **Exp. Cell Res.**, v. 175, p. 184-191, 1988.

SISTEMA NACIONAL DE INFORMAÇÕES TÓXICO-FARMACOLÓGICAS (SINITOX). **Óbitos registrados de intoxicação e/ou envenenamento, Brasil. 2003.** Rio de Janeiro, Fundação Osvaldo Cruz, 2003.

SISTEMA NACIONAL DE INFORMAÇÕES TOXICO-FARMACOLÓGICAS (SINITOX). **Estatística anual de casos de intoxicação e envenenamento.** Rio de Janeiro: Fundação Osvaldo Cruz, 1998. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/sinitox/2003/sinitox2003.htm>>. Acesso em: 19 set 2009.

SISTEMA NACIONAL DE INFORMAÇÕES TOXICO-FARMACOLÓGICAS (SINITOX). **Casos registrados de intoxicação humana e envenenamento, Brasil.** Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/sinitox/2003/sinitox2003.htm>>. Acesso em: 19 set 2009.

SMEETS, S.J; BRAKENHOFF R.H.; YLSTRA B; VAN WIERINGEN W. N.; VAN DE WIEL M.A.; LEEMANS CR; BRAAKHUIS BJ Genetic classification of oral and oropharyngeal carcinomas identifies subgroups with a different prognosis. **Cell Oncol.**; v.31, n. 4, p. 291-300, 2009.

SOARES, W. L.; Freitas, E. A. V.; Coutinho, J. A. G.; Trabalho rural e saúde: intoxicações por agrotóxicos no município de Teresópolis – RJ; **RER, Rio de Janeiro**, v. 43, n. 04, p. 685-701, 2005.

SPEIT, G., SCHMID, O., FROHLER-KELLER M., LANG, I., TRIEBIG, G. Assessment of local genotoxic effects of formaldehyde in humans measured by the micronucleus test with exfoliated buccal mucosa cells. **Mutation Research**, v.627, p. 129-135, 2007.

SPIEWAK, R.; Pesticides as a cause of occupational skin diseases in farmers; **Ann Agric Environ Med.**; v.8, p.1–5; 2001.

SPINELLI J. , CARMEN H. N., WEBER, J. P., CONNORS, J.P., GASCOYNE, R.D., LAI, A.S. BROOKS-WILSON, A.S., LE, N. D., BERRY, B. R. GALLAGHER, R.P. Organochlorines and risk of non-Hodgkin lymphoma. **Int. J. Cancer**: v.121, p. 2767–2775, 2007.

SPIVACK S. D., HURTEAU G.J., JAIN R., KUMAR S.V., ALDOUS K.M., GIERTHY J.F., KAMINSKY L.S. Gene-environment interaction signatures by quantitative mRNA profiling in exfoliated buccal mucosal cells, **Cancer Res.**, v.64, p.6805–6813, 2004.

STELLMAN, S. D. , DJORDJERVIC, M. V., BRITTON, J. A. , MUSTAC, J. E., CITRON, M. L., KEMENY, M., BUSCH, E. & GONG, L.. Breast cancer risk in relation to adipose concentrations of organochloride pesticides and polychlorinated biphenyls in Long Islkand, New York. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v.9, n.11, p. 1241-1249, 2000.

STICH HF; CURTIS JR; PARIDA BB Application of the micronucleus test to exfoliated cells of high cancer risk groups: tobacco chewers. **Int J Cancer**; v.30, n.5, p.553-9, 1982.

STICH HF; ROSIN MP. Quantitating the synergistic effect of smoking and alcohol consumption with the micronucleus test on human buccal mucosa cells. **Int J Cancer**; v.31, n. 3, p. 305-8, 1983.

_____. Micronuclei in exfoliated human cells as a tool for studies in cancer risk and cancer intervention. **Cancer Lett.** v.22, p. 241-253, 1984.

STOPPELLI, I. M. B.; MAGALHÃES; C. P.; Saúde e segurança alimentar: a questão dos agrotóxicos. **Ciênc. saúde coletiva** v.10 2005.

SUPERINTENDÊNCIA DO CONTROLE DE ENDEMIAS (SUCEN). São Paulo, 2001. Disponível em:

<http://www.sucen.sp.gov.br/docs_tec/seguranca/cap11pra.pdf>. Acesso em: 19 out 2009

SZETO, Y. T., BENZIE, I.F.F., COLINS A.R., CHOI, S.W., CHENG, C.Y., YOW, C.M.N., TSE, M.M.Y. A buccal cell model comet assay: Development and evolution for human biomonitoring and nutritional studies. **Mutation Research**, v. 578, p. 371-381, 2005.

TAMBURRO C. H. MAKKA L. e POPPER H. Early Hepatic Histologic Alterations Among Chemical (Vinyl Monomer) Workers. **Hepatolog.**, v. 4, n. 3, p. 413-418, 1984.

TAVARES, J.C; CORNÉLIO D.A; DA SILVA N.B; DE MOURA C.E; DE QUEIROZ J.D; SÁ JC; ALVES C; DE MEDEIROS S.R. Effect of titanium surface modified by plasma energy source on genotoxic response in vitro **Toxicology**; v.262, n.2, p.138-45, 2009.

THERMAN, E.; SUSMAN, M. Cromosomas Humanos; estructura, comportamiento y efectos. **Revista Brasileira de Genética**, p.109-118, 1996.

THYBAUD, M.; AARDEMAB, J.; CLEMENTS, K.; DEARFIELD, S.; GALLOWAY, M.; HAYASHI, D.; JACOBSON-KRAM, D.; KIRKLAND, J.T. MACGREGOR, D.; MARZIN, W.; OHYAMAJ, M.; SCHULER, K.H.; SUZUK, L.; ZEIGERM E. Strategy for genotoxicity testing: Hazard identification and risk assessment in relation to *in vitro* testing **Mutation Research**, v. 627, p. 41–58, 2007

TICE, R. R. ; AGURELL, E. ; ANDERSON, D. ; BURLINSON, B. ; HARTMANN, A. ; KOBAYASHI, H. ; MIYAMAE, Y. ; ROJAS, E. ; RYU, J.C. ; SASAKI, Y. F. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, p. 206-221, 2000.

TITLIC M; JOSIPOVIC-JELIC Z; PUNDA A Headache caused by pesticides--a review of the literature. **Acta Med Croatica** ; v.62, n. 2, p. 233-6, 2008.

TOCCI PM; MANN JB; DAVIES JE; EDMUNDSON WF Biochemical differences found in persons chronically exposed to high levels of pesticides **IMS Ind Med Surg**; v.38, n.6, p.188-95, 1969.

TOLBERT, P. E.; SHY, C. M.; ALLEN J. W. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. **Mutation Research**, v. 271, p. 69-77, 1992.

_____. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: A field test in snuff users. **American Journal of Epidemiologic** , v.134, n.8, p. 840 - 850, 1991.

TORRES-BUGARIN, O., VENTURA-AGUILAR, A., ZAMORA-PEREZ, A., GOMEZ-MEDA, B. C., RAMOS-IBARRA, M. L., MORGAN-VILLELA, G., GUTIERREZ-FRANCO, A. AND ZUNIGA-GONZALEZ, G. Evaluation of cisplatin β 5-FU, carboplatin β 5-FU and ifosfamide β epirubicine regimens using the micronuclei test and nuclear abnormalities in the buccal mucosa. **Mutat. Res.**, v.539, p.177–186. 2003.

TOS-LUTY, S.; TOKARSKA-RODAK, M.; HARATYM-MAJ, A. Selected Parameters of Immunological Response in Hop Growers During The Period Of Intensive Application Of Pesticides. **Ann Agric Environ med.** v.11, p. 227-231, 2004.

TRAPÉ, A. Z. Exposição ocupacional a formulação contendo glifosato / Occupational exposure to glyphosate formulations. **Rev. bras. toxicol**; v.18, n. 2, p. 114-116, 2005.

TRIPPI F; BOTTO N; SCARPATO R; PETROZZI L; BONUCCELLI U; LATORRACA S; SORBI S; MIGLIORE L Spontaneous and induced chromosome damage in somatic cells of sporadic and familial Alzheimer's disease patients. **Mutagenesis**;v.16, n. 4, p. 323-7, 2001.

US EPA - Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos;

VALVERDE, M.,; ROJAS, E. Environmental and occupational biomonitoring using the Comet assay. **Mutation Research**, v.681, p.93–109, 2009

VAN MAELE-FABRY G; DUHAYON S; LISON D. A systematic review of myeloid leukemias and occupational pesticide exposure **Cancer Causes Control**; v. 18, n.5, p. 457-78, 2007.

VARONA, M., CARDENAS, O., CRANE, C., ROCHA, S., CUERVO, G. VARGAS, J. Alteraciones citogenéticas en trabajadores con riesgo ocupacional de exposición a plaguicidas en cultivos de flores en Bogotá. **Biomédica**, v.23, p. 141-52, 2003.

VIGREUX, C.; POUL, J. M.; DESLANDES, E.; LEBAILLY, P. GODARD, T. ; SICHEL F.; HENRY-AMAR M.; GAUDUCHON P. DNA damaging effects of pesticides measured by the single cell gel electrophoresis assay (comet assay) and the chromosomal aberration test, in CHOK1 cells. **Mutation Research** 419: 79-90, 1998.

WALISZEWSKI SM, INFANZON RM, ARROYO SG, PIETRINI RV, CARVAJAL O, TRUJILLO P, HAYWARD-JONES PM., Persistent organochlorine pesticides levels in blood serum lipids in women bearing babies with undescended testis. **Bull Environ Contam Toxicol.**, Nov; v.75, n. 5, p. 952-9, 2005.

WATERS, K. Colcemig effect, *Appl. Cytogenet.*, 75, 1995.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Public health impact of pesticides used in agricultures.** Geneva, 1990.

WHO "Environmental Contamination in Europe," Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, Volume 125, p 101-181, 1992.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY. **Guide to short-terms for detecting mutagenic and carcinogenic chemicals**. Geneva, 1985. (OMS Environmental Health Criteria, 51).

WU PA; LOH CH; HSIEH LL; LIU TY; CHEN CJ; LIOU SH Clastogenic effect for cigarette smoking but not areca quid chewing as measured by micronuclei in exfoliated buccal mucosal cells. **Mutat Res**; v.562, n.1-2, p.27-38, 2004

YANKELEVICH, J. S.; RUBIO, C.; ÁLVARO, S.; PECHEN de D'ÁNGELO, A. M. **Exposure of farm workiers to pesticide in the valley of Rio Negro and Neuquén**. In: CONGRESO INTERNACIONAL DE TOXICOLOGIA DE LOS PAÍSES EM DESARROLLO, 1., Buenos Aires, 1987.

ZAPATA GAYÓN N; ZAPATA GAYÓN C; GONZÁLEZ ANGULO A Alteraciones clastogénicas en cromosomas de una población de individuos ocupacionalmente expuestos a diferentes plaguicidas. **Salud Publica Mex.**; v.29, n. 6, p. 506-11, 1987.

ZELJEZIC D. E GARAJ-VRHOVAC V. Chromosomal aberrations, micronuclei and nuclear buds induced in human lymphocytes by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid pesticide formulation. **Toxicology** v.200, p. 39-47, 2004.

ANEXOS

ANEXO A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Biomonitoramento genético de indivíduos expostos ocupacionalmente a pesticidas no povoado Vila Bessa, município de Conceição do Jacuípe, Bahia.

Você está sendo convidado a participar de um projeto de pesquisa. Sua participação é importante, porém, você não deve participar contra sua vontade. Leia atentamente as informações abaixo e faça qualquer pergunta que desejar para que todas as dúvidas sobre a pesquisa sejam esclarecidas.

Devido ao fato de que algumas substâncias podem alterar o DNA (que é uma pequena partícula encontrada dentro das células e que contém todas as informações que comanda o desenvolvimento e funcionamento de todo o organismo, das células do homem, tornando fácil o desenvolvimento de alguma forma de câncer, torna-se importante e necessária a avaliação dessas substâncias. Ou seja, o potencial dessa substância causar dano (quebra) no DNA das células.

Essa pesquisa pretende avaliar o potencial das substâncias utilizadas como pesticidas (venenos) na lavoura, quanto a possibilidade de alterar o DNA das células do sangue como as das células esfoliadas de mucosa bucal (que são células que fazem parte da boca) . Para isso, será utilizados o Teste do Micronúcleo, Teste Cometa, e o Teste de aberrações cromossômicas, que são testes utilizados em todo o mundo para avaliar essas alterações no DNA. O exame a ser feito é muito simples, e não traz nenhum risco à saúde.

Estudo desse tipo poderá contribuir para o conhecimento dos efeitos dessas substâncias que são usadas rotineiramente na lavoura, quanto à possibilidade de alterar o DNA das células do ser humano. Essa pesquisa se baseia em estudo experimental em que os benefícios aos voluntários, serão de forma indireta, ao se verificar os efeitos maléficos desses pesticidas.

Será necessário responder as perguntas feitas em entrevista. Para ser voluntário é condição indispensável que esteja em boa saúde, e, portanto não esteja, no momento, sob tratamento médico ou fazendo uso de medicações regulares, exceto anticoncepcionais (para mulheres).

Será examinada a boca e será raspado de modo muito leve a parte de dentro da bochecha com uma escova própria, sem causar nenhuma dor, para confecção de lâminas de estudo.

Para a realização da pesquisa, necessitamos de sua colaboração voluntária. Você ajudaria nosso estudo doando 10mL de sangue, que será coletado no pela equipe de pesquisadores devidamente treinado e habilitado para evitar infecções e hemorragias. A retirada de sangue é um procedimento seguro e pode causar um leve desconforto. No entanto, pode ocorrer uma mancha roxa no local da picada da agulha que, normalmente, desaparece de forma espontânea. Esta coleta terá como objetivo também obtenção das células do sangue para estudo e avaliar se seu fígado está trabalhando bem. Será também examinado se você está com verme, as fezes serão coletas em um recipiente descartável que será dado a você.

A pesquisa será desenvolvida pela professora da Universidade Estadual de Feira de Santana e Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, a professora Maria Emilia S. P. Ramos. O material colhido da bochecha será usado para a execução desta pesquisa. Após realização da leitura das lâminas, essas serão guardadas em caixas apropriadas, nos armários do laboratório da faculdade (EBMSP), sob a guarda da professora Dra. Maria Emilia Ramos. Essas lâminas podem ser usadas para novos estudos, respeitando o sigilo e a confidencialidade. Caso novo estudo seja realizado com essas lâminas, novo projeto será encaminhado ao Comitê de Ética em Pesquisa. E os resultados dos exames de sangue e fezes serão trazidos e entregues a você.

E os dados obtidos serão encaminhados para publicação em revistas especializadas e congressos, sendo mantido o sigilo e respeitando a privacidade dos seus voluntários. A qualquer momento você poderá solicitar informações sobre a pesquisa, ou sobre novas pesquisas com as células da bochecha que você doou.

Você poderá entrar em contato com os responsáveis pela pesquisa nos seguintes endereços:

Professora Maria Emilia S. P. Ramos - Av. Augusto Lopes Fontes, 615, Costa Azul, Salvador –Bahia Telefone: 90 (xx) 75 3261-4249 ou (75) 3261-2794 (ligação a cobrar) ou (71) 3257-8200

Declaro que após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, concordo conscientemente em participar da presente pesquisa, permitindo examinar a boca e raspar gentilmente a parte interna da bochecha e deixar fazer a coleta de 10 mL de sangue. Sabendo também que não haverá nenhuma forma de pagamento para ser voluntário.

Salvador, _____ de _____ de 2008

Assinatura:

RG

ANEXO B
QUESTIONÁRIO INDIVIDUAL

Nome:	Identidade:
Endereço	Código de Identificação:
Idade:	Data de nascimento:
Raça 1= Branco 2= Mulato claro 3= Mulato médio	4= Mulato escuro 5= Negro 6= Índio
Anos de estudo:	
<input type="checkbox"/> ≤ 4 anos	
<input type="checkbox"/> > 4 anos e ≤ 8 anos	
<input type="checkbox"/> > 8 anos e ≤ 11 ou mais	
Perguntas	Respostas
Mora no local que trabalha?	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não
Ocupação atual ?	
Tempo de atividade?	
Ocupação anterior?	
Ocupação anterior?	
Uso de antissépticos bucais ?	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não
Escova os dentes?	<input type="checkbox"/> um vez ao dia <input type="checkbox"/> duas vezes ao dia <input type="checkbox"/> três vezes ao dia <input type="checkbox"/> mais de três vezes ao dia <input type="checkbox"/> nenhuma vez ao dia
Está fazendo ou fez tratamento médico para alguma doença no último mês?	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> não sabe
Qual a(s) doença (s) ? especificar:	
Já fez tratamento para:	
<input type="checkbox"/> tuberculose	<input type="checkbox"/> Rubéola
<input type="checkbox"/> HPV	<input type="checkbox"/> Toxoplasmose
<input type="checkbox"/> AIDS	<input type="checkbox"/> Citomegalovirus
<input type="checkbox"/> HTLV	<input type="checkbox"/> Câncer
Você está usando algum remédio?	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não
Nos últimos 30 dias usou:	
1. antibióticos	4. outros
2. antimitótico	5. não usou
3. quimioterápico	
Já tirou raio X para algum tratamento?	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não
Já tirou raio X nos últimos três meses?	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não
Fuma	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não
Consome bebidas alcoólicas	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não

Para o grupo exposto

O que você planta?	
Você usa algum defensivo agrícola (veneno)?	Sim () Não ()
Nome(s) do(s) produto(s) que você usa?	
Com que frequência você usa o(s) produto (s) na agricultura?	
Há quanto tempo você faz uso deste(s) produto(s)?	
Qual o último dia que você usou?	
Como você guarda o produto?	
Como você usa o(s) produto(s)	
O que você faz com o vasilhame do(s) produto(s) após o uso?	
Você usa alguma proteção para aplicar o(s) produto(s)?	() sim () não
Qual(is)?	
Sente algo quando aplica o produto?	() sim () não
Diga o que sente	

Exame Bucal

Apresenta lesão bucal	() sim () não
-----------------------	-----------------

Anexo C

1 - Povoado Vila Bessa



2- Modo de trabalho



3- Aplicação do questionário



4- Exame Clínico Bucal



5 - Coleta de sangue

