



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

TATIANA VIEIRA SOUZA CHAVES

**ESTUDO DAS ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS, BIOQUÍMICAS E
GENOTÓXICAS INDUZIDAS POR AGROTÓXICOS EM AGRICULTORES DO
ESTADO DO PIAUÍ**

FORTALEZA - CEARÁ

2011

TATIANA VIEIRA SOUZA CHAVES

**ESTUDO DAS ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS, BIOQUÍMICAS E
GENOTÓXICAS INDUZIDAS POR AGROTÓXICOS EM AGRICULTORES DO
ESTADO DO PIAUÍ**

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, área de concentração em Farmacologia Clínica.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Elisabete Amaral de Moraes

Co-orientadora: Profa. Dra. Ana Amélia de C. M. Cavalcante

**FORTALEZA - CEARÁ
2011**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

-
- C439e Chaves, Tatiana Vieira Souza
Estudo das alterações hematológicas bioquímicas e genotóxicas induzidas por agrotóxicos em agricultores do estado do Piauí/ Tatiana Vieira Souza Chaves. – 2011.
210 f. : il.
- Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Ceará, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2011.
Orientação: Profa. Dra. Maria Elisabete Amaral de Moraes
Co-orientação: Profa. Dra. Ana Amélia de C. Melo Cavalcante
1. Praguicidas 2. Trabalhadores Rurais 3. Testes de Mutagenicidade 4. Dano ao DNA 5. Ensaio Cometa. I. Título.
-

CDD615.9

TATIANA VIEIRA SOUZA CHAVES

**ESTUDO DAS ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS BIOQUÍMICAS E
GENOTÓXICAS INDUZIDAS POR AGROTÓXICOS EM AGRICULTORES DO
ESTADO DO PIAUÍ**

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, área de concentração em Farmacologia Clínica.

Aprovada em 26 setembro de 2011.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Maria Elisabete Amaral de Moraes (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará - UFC

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

Prof^a. Dr^a. Danielle Silveira Macedo
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof^a. Dr^a. Ana Amélia de C. Melo Cavalcante
Universidade Federal do Piauí - UFPI

Prof. Dr. Sharbel Weidner Maluf
Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

DEDICATÓRIA

*Aos milhares de trabalhadores rurais de todo o
Estado do Piauí, que hoje padecem vítimas de
intoxicação por agrotóxicos*

DEDICATÓRIA ESPECIAL

Ao meu neto, Aquiles Chaves.

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

Ao meu Senhor Deus agradecer é muito pouco, pois sua misericórdia comigo é ilimitada, reconheço mais esta oportunidade em minhas mãos, sei das imensas dificuldades, das vezes que pensei em desistir e sei que sem sua bênção nenhuma vitória é possível e nenhum obstáculo é intransponível. Agora, vejo os momentos da minha caminhada em que apenas um par de pegadas é visível e agradeço mais uma vez por me levar em teus braços sempre que precisei. Agradeço a minha mãe Maria por desde sempre me proteger sob seu véu, seu amor e sua serenidade.

Esta vitória, hoje, realidade é possível unicamente por meio do desprendimento e contribuição de diversas pessoas e instituições. Tenho muito a agradecer e, por mais que o faça, será o mínimo de reconhecimento devido.

Aos meus filhos, Aline, Italo e Thiago, por compreenderem minha ausência e acreditarem na realização deste trabalho, me estimulando a prosseguir sempre. Aos meus novos filhos Priscila e Thallys pelo carinho e atenção que sempre me foi oferecido da forma mais sincera.

Ao meu neto Aquiles, por iluminar meus dias com seu sorriso e me dar forças para continuar mesmo no auge do cansaço.

Ao Chaves, pela dedicação e colaboração em vários momentos de desafio da minha vida profissional e pessoal, por tantas horas, dias e meses me aceitar com tanta paciência e entender meus momentos de isolamento para contribuir comigo na busca desta conquista.

A minha querida mãe, exemplo de vida e determinação que tanto me motivou nos momentos de provação, peço desculpas pelas vezes que não pude lhe ouvir como é merecido, e que hoje, comemora comigo mais uma vitória.

Ao Fabrício Amaral e sua família (Elna e filhos), de forma especial, pelo apoio incondicional, por todas as horas e dias dedicados a organização deste trabalho e pela sua competência profissional, companheirismo e amizade.

À Idiacira Pinheiro pela amizade, companheirismo e colaboração durante os mais diversos momentos da minha vida profissional.

À Socorro Cronemberger, Solange Teles, Danielle Sampaio, Rogério Bitu (sempre presente), Carmem Dolores Medeiros, Giuliano Miranda, Ana Cleide, Alberto Faustino, Eduardo Probo e Dilson, pela presteza, amizade e colaboração na coleta de dados e demais atividades que colaboraram durante todo período.

Ao Benedito Júnior, pela paciência e dedicação durante tantas horas dispensadas na digitação do texto, elaboração dos gráficos e tabelas.

Ao Osvaldo Bonfim e Ronaldo Costa e toda a equipe do LACEN pela colaboração na realização dos exames laboratoriais.

À professora Dra. Ana Amélia Melo por toda sua dedicação ao longo de quase seis anos me transmitindo seus ensinamentos, estando sempre disponível para contribuir com todas as etapas desta missão.

À Vera Regina Cavalcante que foi companheira durante tantas horas, pois sua dissertação de mestrado é parte deste trabalho, sua dedicação tão valiosa nos permeou de forças para chegarmos até a etapa final.

Aos meus alunos e orientandos de Biomedicina Rodrigo Mendes de Carvalho e Débora Cássia V. Gomes pela sua intensa colaboração na realização de todos os testes, padronização das técnicas e dedicação durante tantas horas de estudo.

À Aracelli Leite e Rita Berrêdo que com tanta paciência realizaram comigo vários testes e leitura de tantas lâminas que as vezes tornava-se um trabalho interminável.

Aos professores Dra. Elisabete Moraes e Dr:Odorico de Moraes da Universidade Federal do Ceará por despertar-me para a pesquisa, pelo apoio, estímulo e compreensão e amizade durante a elaboração do trabalho.

À professora Dra. Gisela Camarão, pelo apoio e carinho dispensados no decorrer da caminhada.

À Fábria Beserra, Maria Teresa Rocha, Flávia Martins e Aura Rhanes, pela amizade, delicadeza e presteza dispensadas em todo decorrer dos anos.

À professora Dra. Cristina Miranda em nome da Faculdade NOVAFAPI, pelo estímulo, apoio e oportunidade para realização de mais esta etapa na minha vida profissional.

Aos colegas da Vigilância Sanitária e do CEREST, pelo afeto e amizade transmitidos no decorrer da caminhada.

À Secretaria do Estado da Saúde do Piauí pelo apoio institucional.

Ao FINEP, MCT, MS, FUNCAP, CNPq, CAPES e Instituto Claude Bernard (InCB), pelo incentivo no desenvolvimento da pesquisa nacional.

Aos trabalhadores rurais, pela gentileza em contribuir na pesquisa de campo.

Obrigada, e que Deus abençoe a todos que, apesar de não citados nominalmente, colaboraram de forma grandiosa comigo.

*"Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível, e
de repente você estará fazendo o impossível."*

São Francisco de Assis

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Aberrações Cromossômicas
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
ADAPI	Agência de Defesa Agropecuária do Piauí
ALP	Fosfatase Alcalina
ALT	Alanina Aminotransferase
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AST	Aspartato Aminotransferase
BChE	Acetilcolinesterase Plasmática ou Butirilcolinesterase
BN	Células Binucleadas
CbMN	Micronúcleo com bloqueio de citocinese
CEPRO	Centro de Pesquisas Econômicas Sociais do Piauí
CEREST	Centro Estadual de Referência em Saúde do Trabalhador
CHCM	Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média
CL	Cariólise
CR	Cariorrexe
DIVISA	Diretoria de Unidade de Vigilância Sanitária do Estado do Piauí
DNA	Ácido Dextribonucléico
EDTA	Ácido etileno diaminotetracético
EPI	Equipamento de Proteção Individual
EROS	Espécie Reativa de Oxigênio
FD	Frequência de dano
GGT	Gama glutamil transpeptidase ou transferase
Hb	Hemoglobina
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
Ht	Hematócrito
I M	Índice Metafásico
ICPEMC	International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens-
IARC	International Agency for Research on Cancer
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ID	Índice de danos

IDN	Índice de Divisão Nuclear
IDNC	Índice de Divisão Nuclear com Citotoxicidade
IR	Índice de Reparo
LABTOXIGEN	Laboratório de Toxicologia e Genética Molecular
LACEN	Laboratório Central de Saúde Pública do Estado do Piauí
MN	Micronúcleo
MS	Ministério da Saúde
OF	Organofosforado
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
PARA	Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos
PCP	Sais Pentaclorofenol
PDW	Índice de anisocitose plaquetas
PIB	Produto Interno Bruto
PND	Programa Nacional de Desenvolvimento
RBCs	Célula Sanguínea no Sangue Total
RENAST	Rede Nacional de Atenção Integral à Saúde do Trabalhador
SDR	Secretaria Estadual de Desenvolvimento Rural
SES	Secretaria Estadual de Saúde do Piauí
SINAN	Sistema de Informação Nacional de Agravos de Notificáveis
SINDAG	Sindicato dos Produtores de Defensivos Agrícolas
SINITOX	Sistema Nacional de Informações Tóxico-farmacológico
SNA	Sistema Nervoso Autônomo
SNC	Sistema Nervoso Central
SUS	Sistema Único de Saúde
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGO	Transaminase Glutâmico Oxalacética
TGP	Transaminase Glutâmico Pirúvica
UFC	Universidade Federal do Ceará
US-EPA	Environmental Protection Agency
WHO	World Health Organization
VCM	Volume Corpuscular Médio
VPM	Determinação do Volume Plaquetário

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Mecanismo de Ação dos Agrotóxicos.....	47
Figura 2	Caracterização dos biomarcadores da exposição ambiental as toxinas. (Adaptado de Farmer e Singh, 2008).....	51
Figura 3	Mecanismo de ação de genes envolvidos em reparo de DNA, a exemplo do p53 (Adaptado de Mori <i>et al.</i> , 2002).....	63
Figura 4	Formação de micronúcleo: (a) Origem de um MN a partir de um cromossoma inteiro e fragmentos cromossômicos acêntricos na anáfase; (b) formação de uma ponte a partir de cromossomas dicêntricos, onde os centrômeros se dirigem para os lados opostos da célula (Adaptada de Fenech, 2000).....	65
Figura 5	Secção da mucosa bucal indicando seus diferentes extratos, bem como o aparecimento de micronúcleos e de anormalidades nucleares (Adaptada de Thomas <i>Et al.</i> , 2007).....	67
Figura 6	Modelo esquemático do teste em mucosa bucal mostrando as diferentes células e os possíveis mecanismos de origem relativos à morte celular e aos danos ao DNA. (Adaptado de Holland <i>et al.</i> , 2008).....	69
Figura 7	Mecanismos de formação de micronúcleos com bloqueio de citocinese. Adaptada de Iarmarcovai <i>et al.</i> , 2008.....	70
Figura 8	Vias da apoptose . Adaptada de Roos e Kaina (2006).....	72
Figura 9	(A) Deleções Cromossômicas; (B) Formação do anel cromossômico; (C) Cromossomo dicêntrico. (Adaptado de Thompson e Thompson, 1991).....	74
Figura 10	Relações entre os fatores de riscos genéticos, estilo de vida e mutações ao DNA, com exposição ambiental e ocupacional a agente genotóxicos. Adaptada de Thier <i>et al.</i> , 2003.....	76
Figura 11	Municípios piauienses selecionados para o biomonitoramento dos riscos dos agrotóxicos em agricultores.....	88
Figura 12	Esquema do teste de cometa conforme protocolo de Singh <i>et al</i> (1988) usado para a avaliação de genotoxicidade em agricultores expostos aos agrotóxicos.....	97

Figura 13	Classes de Danos ao DNA analisados no Teste Cometa (Adaptado de Villela <i>et al.</i> , 2006).....	98
Figura 14	Esquema do teste de cometa em cultura de linfócitos conforme protocolo de Singh <i>et al</i> (1988) e Saran (2008) usado para a avaliação de genotoxicidade em agricultores expostos aos agrotóxicos.	100
Figura 15	Esquema do Teste de MN em mucosa bucal representado segundo protocolo de Holland <i>et al.</i> (2008)	102
Figura 16	Esquema representativo do Teste de Micronúcleo com Bloqueio de Citocinese, segundo o protocolo de Salvadori <i>et al.</i> (2006).....	104
Figura 17	Esquema representativo do Teste de Aberrações Cromossômicas segundo o protocolo de Sram <i>et al.</i> (2007).....	105
Figura 18	Percentual de agrotóxicos, segundo grupo químico, utilizados pelos agricultores em municípios do Piauí, nos anos 2008 a 2010.....	112
Figura 19	Percentual de agrotóxicos segundo classe toxicológica, usados pelos agricultores em municípios do Piauí, nos anos de 2008 a 2010.....	115
Figura 20	Avaliação de leucopenia em trabalhadores expostos aos agrotóxicos no Piauí nos anos 2008 a 2010.	118
Figura 21	Perfil bioquímico para fosfatase alcalina em trabalhadores expostos e não expostos aos agrotóxicos no Piauí no ano 2008 a 2010.....	120
Figura 22	Perfil bioquímico para butilcolinesterase em trabalhadores expostos e não expostos aos agrotóxicos no Piauí no ano 2008 a 2010.....	122
Figura 23	Genotoxicidade em células esfoliadas de mucosa bucal em agricultores do Piauí (2008 a 2010) observado pelas classes de danos (0-4). Significância em $p < 0,001$, em relação aos trabalhadores expostos (n=97) comparados com os não expostos (n=55) analisados pelo teste t.....	125
Figura 24	Perfil eletroforético característico para as classes de danos observadas por microscopia óptica num aumento de 400x em trabalhadores expostos aos agrotóxicos no Estado do Piauí, ano 2008 a 2010.	126
Figura 25	Fotomicrografia das classes de danos em linfócitos de trabalhadores expostos aos agrotóxicos no Estado do Piauí ano 2008 a 2010.....	127

Figura 26	Genotoxicidade em linfócitos de sangue periférico de agricultores do Piauí, observado pelas classes de danos (0 - 4). Significância em $p < 0,001$, em relação aos trabalhadores não expostos analisado com o teste t.	130
Figura 27	Mutagenicidade, avaliada pela frequência de micronúcleos em mucosa bucal de trabalhadores expostos aos agrotóxicos no Piauí (2008 a 2010). Significância em $p < 0,001$, em relação aos trabalhadores não expostos analisado com o teste t.....	134
Figura 28	Fotomicrografias de células de epitélio esfoliado de mucosa bucal sem anormalidade e com micronúcleos, indicativos de mutagenicidade em agricultores expostos aos agrotóxicos no Piauí no ano 2008 a 2010.	134
Figura 29	Fotomicrografias mostrando a presença de micronúcleos em linfócitos binucleados, com bloqueio de citocinese indicando mutagenicidade em indivíduos expostos aos agrotóxicos no Piauí (2008 a 2010).	137
Figura 30	Aberrações cromossômicas estruturais encontradas em agricultores expostos aos agrotóxicos no Piauí (2008 a 2010), identificadas pelo percentual de AC calculados em 100 metáfases identificadas em 300 células. Significância em $p < 0,001$, em relação aos trabalhadores não expostos.....	142
Figura 31	Fotomicrografias dos cromossomos normais e das AC identificadas em trabalhadores expostos a misturas complexas de agrotóxicos, ano 2008 a 2010. Em (A) observa-se cromossomos estruturalmente normais; (B) vários cromossomos formando anéis acêntricos; (C) aberração cromatídicas do tipo quebra; (D) cromossomos dicêntricos e tricêntrico.....	143
Figura 32	Indicativo de apoptose, pelas frequências de cariólise e de binucleadas em células de mucosa bucal de agricultores expostos aos agrotóxicos no Piauí 2008 a 2010 Significância em $p < 0,001$ em relação aos trabalhadores não expostos analisado com o teste t.....	146
Figura 33	Apoptoses evidenciadas em células esfoliadas de mucosa bucal de agricultores do Piauí expostos aos agrotóxicos (2008 a 2010)	147

identificadas por cariorrexes, cariólises e células binucleadas. A, B e E mostram células em cariorrexe (fragmentação nuclear); C e D mostram células em cariólise(dissolução nuclear) e F e G, células binucleadas.

- Figura 34** Necroses (A) e apoptoses (B) evidenciadas em linfócitos de sangue periférico de agricultores do Piauí expostos aos agrotóxicos (2008 a 2010), identificadas com o teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese. Significância em $p < 0,001$ em relação aos trabalhadores não expostos analisado com o teste t..... 149
- Figura 35** Apoptose (A) e Necrose (B) evidenciadas em linfócitos de sangue periférico de agricultores do Piauí expostos aos agrotóxicos (2008 a 2010), identificadas com o teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese. Significância em $p < 0,001$ em relação aos trabalhadores não expostos analisado com o teste t..... 150

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Classe dos agrotóxicos mais comercializados no Estado do Piauí, ano 2009.	38
Tabela 2	Efeitos dos agrotóxicos na saúde humana (Adaptada de Peres e Moreira, 2003 e Guterres, 2003).	42
Tabela 3	Fontes de exposição humana a agentes mutagênicos (Adaptada de Ribeiro e Marques, 2003).	49
Tabela 4	Uso e medidas com o teste cometa em diferentes estágios de biomonitoramento (Adaptada por Gyorffy, 2008).....	62
Tabela 5	Comparações morfológicas e bioquímicas entre apoptose e necrose (Adaptada por Kirsch-Volders e Fenech, 2001).....	71
Tabela 6	Características da população exposta aos agrotóxicos em municípios do Piauí, ano de 2008 a 2010, comparada a não exposta.....	108
Tabela 7	Características do estilo de vida da população, exposta e não exposta aos agrotóxicos em municípios do Piauí, ano de 2008 a 2010.....	110
Tabela 8	Características alimentares da população, exposta e não exposta aos agrotóxicos em municípios do Piauí, ano de 2008 a 2010.....	111
Tabela 9	Tipos de agrotóxicos referidos pelos trabalhadores rurais nos municípios piauienses pesquisados no ano 2008 a 2010.....	113
Tabela 10	Avaliação dos parâmetros hematológicos em agricultores expostos e não expostos aos agrotóxicos em municípios do Piauí, ano 2008 a 2010.....	117
Tabela 11	Avaliação dos parâmetros bioquímicos em agricultores expostos e não expostos aos agrotóxicos em municípios do Piauí, ano 2008 a 2010.....	119
Tabela 12	Avaliação dos parâmetros bioquímicos de função hepática, em agricultores expostos e não expostos aos agrotóxicos em municípios do Piauí, ano 2008 a 2010.....	121
Tabela 13	Avaliação genotóxica em células esfoliadas de mucosa bucal de agricultores expostos e não expostos aos agrotóxicos em municípios do Piauí, ano 2008 a 2010.....	125
Tabela 14	Avaliação genotóxica em linfócitos de agricultores expostos e não expostos aos agrotóxicos em municípios do Piauí, ano 2008 a 2010.....	127

Tabela 15	Mutagenicidade avaliada pelo teste MN nos indivíduos expostos e não expostos a misturas complexas de agrotóxicos no Piauí no ano 2008 a 2010.....	133
Tabela 16	Mutagenicidade em linfócitos de agricultores expostos no Estado do Piauí 2008 a 2010, avaliados com o teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese.....	136
Tabela 17	Mutagenicidade em linfócitos de agricultores expostos aos agrotóxicos no Estado do Piauí (2008 a 2010), avaliada com o teste de aberrações cromossômicas.	140
Tabela 18	Anormalidades nucleares indicativas de apoptose e citotoxicidade, avaliadas pelo teste MN em células de mucosa bucal, em agricultores piauienses expostos aos agrotóxicos no ano de 2008 a 2010.....	145
Tabela 19	Apoptose e necrose em linfócitos de agricultores piauienses expostos aos agrotóxicos (2008 a 2010), avaliadas com o teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese.....	148
Tabela 20	Correlações positivas entre os fatores de risco ocupacionais e não ocupacionais e genotoxicidade, mutagenicidade em trabalhadores do Piauí expostos a agrotóxicos, com o teste de cometa, micronúcleo e aberração cromossômica no ano 2008 a 2010.....	151

RESUMO

ESTUDO DE POSSÍVEIS ALTERAÇÕES GENÉTICAS INDUZIDAS POR AGROTÓXICOS EM AGRICULTORES DO ESTADO DO PIAUÍ. Tatiana Vieira Souza Chaves. Orientadora: Maria Elisabete Amaral de Moraes. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, UFC, 2011.

A exposição aos agrotóxicos representa um risco em potencial para a saúde humana. Além das intoxicações, estes compostos podem interagir com o DNA, causando doenças degenerativas e câncer. A avaliação de riscos aos agrotóxicos foi realizada em 97 agricultores dos municípios de Picos, Piripiri, Barras e José de Freitas, tendo como grupo não exposto 55 trabalhadores administrativos da capital, Teresina, como uma proposta de continuidade dos estudos anteriormente realizados nos municípios: Baixa Grande do Ribeiro, Ribeiro Gonçalves e Uruçuí, região sul do Piauí. O objetivo desta pesquisa foi avaliar os possíveis efeitos tóxicos e genotóxicos/mutagênicos da exposição ocupacional às misturas complexas de agrotóxicos, com o uso de biomarcadores hematológicos, enzimáticos e genotóxicos/mutagênicos. Aplicou-se um questionário recomendado pela International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens-ICPEMC, e coletou-se material biológico, para as análises hematológicas, bioquímicas, genotóxicas e mutagênicas. A população exposta aos agrotóxicos apresentou uma média de idade de 40,37 anos e tempo de trabalho de 19,32 anos, com carga horária de 41,38 h/semanas e apenas 50,5% usam EPIs, e 33% são fumantes; 59,8% consomem álcool; 34% utilizam medicamentos prescritos; 54,6% foram vacinados nos últimos 6 meses; 68% não consomem vegetais, e 96,9% comem carne. Os agricultores utilizam 13 diferentes tipos de ingredientes ativos, sendo 53,5% de herbicidas. Quanto aos parâmetros hematológicos apenas 39% apresentaram leucopenia e 10% diminuição na série vermelha. Quanto as variáveis bioquímicas: ureia, proteínas totais e frações, Gama GT não ocorreram alterações significantes, entretanto nas dosagens de creatinina, TGO, TGP e fosfatase alcalina, houve significância ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle. Foi observado para a butilcolinesterase inibição no percentual de cerca de 4%, dado não significativo. Foi evidenciada genotoxicidade nos agricultores expostos pelo significativo ($p < 0,001$) aumento do Índice de Dano (45,85 vs 12,51) e Frequência de Dano (29,41 vs 9,98), em mucosa bucal, e em linfócitos com Índice de Dano (33,27 vs 10,12) e Frequência de Dano (21,44 vs 9,38), avaliados pelo teste do cometa. A avaliação mutagênica pelo aumento do número ($4,95 \pm 2,81$ vs $0,72 \pm 1,20$) e frequência ($0,24 \pm 0,14$ vs $0,03 \pm 0,06$) de MN em mucosa bucal foi estatisticamente significativa ($p < 0,001$) nos expostos em relação aos não expostos. A mutagenicidade em linfócitos avaliados com o teste de Micronúcleo (MN) com bloqueio de citocinese foi significativa ($p < 0,01$) nos agricultores expostos ($9,38 \pm 1,05$), em relação ao não exposto ($5,50 \pm 0,84$). Aumento significativo ($p < 0,001$) do percentual de aberrações cromossômicas dos expostos em relação aos não expostos $3,24 \pm 0,44$ vs. $0,40 \pm 0,07$) foram observados, com significância ($p < 0,001$) para os tipos de AC: cromossomos dicêntricos, anéis, tricêntricos, anel acêntrico, deleção terminal, deleção intersticial. Indicativo significativo ($p < 0,001$) para apoptose foi encontrado em células de mucosa bucal e em linfócito, com bloqueio de citocinese. Correlações positivas significantes ($p < 0,01$; $p < 0,05$) de danos ao DNA, em células de mucosa bucal foram evidenciadas para idade, tabagismo, etilismo e tempo de trabalho, no entanto, essas correlações não foram observadas para a os micronúcleos. Em células de mucosa bucal a apoptose e células binucleadas foram significativamente ($p < 0,01$) correlacionadas com a idade do trabalhador. Em relação aos MN em linfócitos, percentual de AC e apoptose foram observadas correlações positivas com o etilismo ($p < 0,01$). MN em linfócitos foi correlacionado de maneira significativa ($p < 0,05$) com o baixo consumo de micronutrientes e com o uso de EPI. Os parâmetros de genotoxicidade e de mutagenicidade foram indicativos de instabilidade genética, que podem sugerir riscos de neoplasias. Assim, se faz necessário o biomonitoramento desses agricultores, como uma estratégia de vigilância em saúde, com prevenção e promoção da saúde ocupacional no Estado do Piauí.

Palavras-chave: Agrotóxico. Trabalhadores rurais. Teste genotóxico e citogenético. Dano ao DNA. Ensaio em Cometa.

ABSTRACT

ABSTRACT

STUDY OF POSSIBLE GENETIC CHANGES INDUCED BY PESTICIDES IN FARMERS IN THE STATE OF PIAUÍ. Tatiana Vieira Souza Chaves. Advisor: Maria Elisabete Amaral de Moraes. Doctoral Thesis. Graduate Program in Pharmacology. Department of Physiology and Pharmacology, UFC, 2011.

Exposure to pesticides represents a potential risk to human health. In addition to poisoning, these compounds may interact with DNA, causing degenerative diseases, including cancer. The risk assessment for pesticides was conducted in the municipalities of Picos, Piripiri, Barras and José de Freitas with farm workers (exposed group) and 55 administrative officers from Teresina (Capital) as unexposed group. It was as a proposal for the continuation of studies previously performed in other cities of Piauí (Baixa Grande do Ribeiro, Ribeiro Gonçalves and Uruçui). The purpose of this study was to evaluate the toxicity and genotoxicity/mutagenicity effects of occupational exposure to complex mixtures of pesticides by using hematologic, enzymatic and genotoxic/mutagenic biomarkers. Initially, a questionnaire recommended by the International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens-ICPEMC was applied, then biological material was collected for the hematological, biochemical, genotoxic and mutagenic analysis. The population exposed to pesticides (n = 97) had a mean age of 40.37 years and a mean working time of 19.32 years, with a schedule of 41.38 hours per week. 50.5% of the farmers use personal protective equipment (PPE). About their lifestyle, 33% were smokers; 59.8% consume alcohol; 34% use prescription drugs; 54.6% were vaccinated in the last 6 months; 68% do not consume vegetables, and 96.9% eat meat. They use 13 different types of active ingredients, 53.5% are herbicides. As for hematological parameters of the 97 workers exposed, only 39% presented leucopenia, and only 10% presented low red blood cell count. The biochemical variables: urea, total proteins and fractions, Gamma GT, there were no significant changes. However, the dosages of creatinine, AST, ALT and alkaline phosphatase, showed significant changes ($p < 0.05$) compared to the control group. It was also observed that butylcholinesterase inhibition was a non-significant data. Genotoxicity was observed on the exposed farmers ($p < 0.001$), as seen in the damage index (45.85 vs 12.51) and the damage frequency (29.41 vs. 9.98) in exfoliated cells. We found a high damage index (33.27 vs. 10.12) and frequency of damage (21.44 vs. 9.38) in the lymphocytes of the exposed farmers, when assessed by the comet test. The mutagenic evaluation by the increase of micronuclei (MN) in oral mucosa was also statistically significant ($p < 0.001$) in the exposed farmers (4.95 ± 2.81) compared to those not exposed (0.72 ± 1.20), as well as the increase in the frequency of MN (0.24 ± 0.14 vs. 0.03 ± 0.06). Similarly, mutagenicity in the lymphocytes evaluated by the MN test with cytokinesis block was observed ($p < 0.01$) in the farmers ($p < 0.001$) when compared to the unexposed group (9.38 ± 1.05 vs. 5.50 ± 0.84). Significant increase ($p < 0.001$) in the percentage of chromosomal aberrations (CA) in exposed workers compared to the unexposed (3.24 ± 0.44 . vs. 0.40 ± 0.07) were observed, with significance ($p < 0.001$) for the types of AC: dicentric chromosomes, rings, tracentrics, acentric ring, terminal deletion and interstitial deletion. Significant evidence ($p < 0.001$) for apoptosis was found in oral mucosa cells and lymphocytes, with cytokinesis blocking. Positive correlations ($p < 0.01$, $p < 0.05$) of DNA damage in oral mucosa cells were found for age, smoking, drinking and working time. However, these correlations were not observed for the micronuclei. In oral mucosa cells, apoptosis and binucleated cells were significantly ($p < 0.01$) correlated with the age of the worker. Regarding the MN in lymphocytes, the percentage of AC and apoptosis, positive correlations with the alcohol consumption ($p < 0.01$) was observed. MN in lymphocytes was also significantly correlated ($p < 0.05$) with the low intake of micronutrients and the use of PPE. The parameters of genotoxicity and mutagenicity were indicative of genetic instability, which may suggest the risk of cancer. Thus, the biomonitoring of these farmers is necessary as a strategy for health surveillance, prevention and promotion of occupational health in the state of Piauí.

Keywords: Agrotoxic. Agriculture workers. Genotoxicity. Citotoxicity. DNA damage. Comet assay.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	35
1.1 Exposição Humana aos Agrotóxicos.....	35
1.2 Mecanismo de Ação dos Agrotóxicos.....	43
1.3 Instabilidade genética.....	47
1.4 Biomonitoramento Ocupacional da População.....	50
1.4.1 Biomarcadores hematológicos e Bioquímicos.....	53
1.4.2 Biomarcadores de genotoxicidade.....	59
1.4.2.1 Teste cometa em mucosa bucal e em sangue periférico.....	60
1.4.2.2 Teste de micronúcleos em células de mucosa bucal e com bloqueio de citocinese.....	64
1.4.2.3 Teste de aberrações cromossômicas.....	73
1.4.3 Fatores de interferência não ocupacionais.....	75
1.4.3.1 Idade e gênero.....	77
1.4.3.2 Tabagismo.....	78
1.4.3.3 Etilismo.....	79
1.4.3.4 Micronutrientes.....	79
1.4.3.5 Polimorfismos de genes.....	80
2 JUSTIFICATIVA.....	83
3 OBJETIVOS.....	85
3.1 Objetivo Geral.....	85
3.2 Objetivos Específicos.....	85
4 METODOLOGIA.....	87
4.1 Tipo de Estudo.....	87
4.2 Caracterização dos Grupos de Estudos.....	87

4.3 Caracterização dos Municípios.....	89
4.4 Aspectos Éticos.....	90
4.5 Seleção da Amostra.....	90
4.6 Coleta e Transporte das Amostras.....	91
4.7 Avaliação Hematológica.....	92
4.8 Avaliação Bioquímica.....	92
4.9 Avaliação Genotóxica.....	95
4.9.1 Teste do cometa em células de mucosa bucal.....	95
4.9.2 Teste do cometa em linfócitos de sangue periférico.....	98
4.10 Avaliação Mutagênica.....	100
4.10.1 Teste de micronúcleo em células esfoliadas de epitélio bucal.....	100
4.10.2 Teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese.....	102
4.10.3 Teste de aberrações cromossômicas em cultura de linfócitos.....	104
4.11 Avaliação Estatística.....	106
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	108
5.1 Caracterização da População.....	108
5.2 Avaliação Hematológica e Bioquímica.....	116
5.3 Avaliação Genotóxica com o Teste do Cometa em Mucosa Bucal.....	124
5.4 Avaliação Genotóxica com o Teste do Cometa em Linfócitos.....	126
5.5 Avaliação Mutagênica com o Teste de Micronúcleo em Mucosa Bucal.....	131
5.6 Avaliação Mutagênica com o Teste de Micronúcleos com Bloqueio de Citocinese.....	136
5.7 Avaliações Mutagênicas em Linfócitos, com o Teste de Aberrações Cromossômicas.....	139
5.8 Avaliações de Anormalidades Nucleares em Células Esfoliadas de Mucosa Bucal e em Linfócitos.....	144

5.9 Influências de Fatores de Riscos não Ocupacionais e Ocupacionais na Avaliação da Genotoxicidade e Mutagenidade em Agricultores expostos aos Agrotóxicos no Piauí, ano de 2008 a 2010.....	150
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	156
7 CONCLUSÃO.....	162
8 RECOMENDAÇÕES.....	164
REFERÊNCIAS.....	168
ANEXOS E APÊNDICES.....	194
APÊNDICE A: FOTOS DA REALIZAÇÃO DA PESQUISA DE CAMPO.....	195
ANEXO A: APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....	197
ANEXO B: QUESTIONÁRIO DE SAÚDE PESSOAL APLICADO A TRABALHADORES EXPOSTOS E NÃO EXPOSTOS AOS AGROTÓXICOS.....	198
ANEXO C: VALORES DE REFERENCIA UTILIZADOS PARA ANALISE HEMATOLOGICA.....	204
ANEXO D: VALORES DE REFERÊNCIA UTILIZADOS PARA ANALISE BIOQUIMICA.....	205
ANEXO E: FICHAS DE AVALIAÇÃO DOS TESTES GENOTOXICOS E MUTAGÊNICOS.....	207

1 INTRODUÇÃO

1.1 Exposição Humana aos Agrotóxicos

A saúde do trabalhador constitui um campo na área da saúde coletiva em plena construção, cujo objeto está centrado no processo saúde-doença dos trabalhadores dos diversos grupos populacionais, em sua relação com os riscos ocupacionais. Busca, portanto, estabelecer causas de agravos à sua saúde, reconhecer seus determinantes, estimar riscos, conhecer os modos de prevenção e promover a saúde (MENDES; DIAS, 1999).

Como uma área da saúde, visa à intervenção nas relações entre o trabalho e a saúde, a promoção e a proteção da saúde do trabalhador, por meio de ações de vigilância dos riscos presentes nos ambientes e condições de trabalho, dos agravos à saúde do trabalhador e a organização e prestação da assistência aos trabalhadores, compreendendo procedimentos de diagnóstico, tratamento e reabilitação de forma integrada (BRASIL, 2001).

O Ministério da Saúde, considerando o disposto no artigo 198 da Constituição Federal de 1988, os preceitos da Lei Orgânica de Saúde nº 8080/90 e a necessidade de articular no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS) as ações de prevenção, promoção e recuperação da saúde dos trabalhadores, com suas especificidades, consoante com os princípios da equidade, integralidade e universalidade. A saúde do trabalhador é definida como:

um conjunto de atividades que se destina, através das ações de vigilância epidemiológica e sanitária, à promoção e proteção da saúde do trabalhador, assim como visa à recuperação e reabilitação da saúde dos trabalhadores submetidos aos riscos e agravos advindos das condições de trabalho, abrangendo a assistência ao trabalhador vítima de acidentes de trabalho ou portador de doença profissional e do trabalho (BRASIL, 1990).

No processo de produção agrícola no Brasil, apesar da sua diversidade, pode-se identificar cargas laborais comuns tais como: os acidentes com os instrumentos de trabalho, as precárias condições dos meios de transporte, a exposição aos agrotóxicos e conseqüentes intoxicações, bem como, as mudanças de temperatura, traumas ou acidentes a elas relacionados. Igualmente similares são as cargas biopsíquicas, que produzem padrões de desgaste expressos através de doenças ósteoarticulares, estresse, alcoolismo e úlcera gástrica, resultando em envelhecimento precoce e morte prematura (LEVIGARD, 2001).

A intensiva agricultura moderna produz significantes efeitos negativos que são bem documentados na literatura de diversas áreas do conhecimento científico, com efeitos prejudiciais para a produção de alimentos contaminados, com deteriorização dos ecossistemas e implicações econômicas, e efeitos para a saúde humana, especialmente a dos trabalhadores (TRAVISI; NIJKAM, 2008). O uso de agrotóxicos favoreceu a intensificação da produção de alimentos em diversas partes do mundo e ajudou a reduzir a incidência de doenças transmitidas por vetores, mas, seus efeitos negativos se fazem sentir, cada vez mais, na saúde humana e no meio ambiente.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou em 1990, aproximadamente três milhões o número de intoxicações agudas provocadas por agrotóxicos no mundo, sendo que 220 mil resultavam em óbito (OPAS/OMS, 1996). A intoxicação ocupacional e a contaminação de alimentos foram os principais fatores identificados. Considerando-se que 85% dos agrotóxicos utilizados no mundo são consumidos na atividade agrícola pode-se imaginar o seu impacto no perfil de morbimortalidade ocupacional (OMS, 1990).

A entrada dos agrotóxicos no Brasil a partir da década de 1960 colocou-os definitivamente no cotidiano dos trabalhadores rurais, aumentando, assim, os riscos de adoecer e morrer, aos quais já estavam expostos. Com o Plano Nacional de Desenvolvimento (PND), em 1975, houve a abertura do Brasil ao comércio internacional, e, nos termos do PND desses o agricultor estava obrigado a comprar os agrotóxicos para obter recursos do crédito rural. Em cada financiamento requerido, era obrigatoriamente incluída uma cota definida de agrotóxicos e essa

obrigatoriedade, somada à propaganda dos fabricantes, determinou o enorme incremento e disseminação da utilização dos agrotóxicos no Brasil (GARCIA, 1996).

O Piauí tem extensão territorial de 251.529,186 km². A expansão agrícola em implemento nos cerrados, por intermédio da intensificação do plantio de soja a partir da década de 1990, consistiu em um forte fator para o aumento do uso de agrotóxico (CHAVES, 2007). Em 2006, ocorreu um aumento das áreas de lavoura de 138 mil hectares (11,4%) em relação ao censo agropecuário 1995-1996 (IBGE, 2006). A procura destes produtos no Estado cresce progressivamente, em 1994, foram vendidas 08 (oito) toneladas e em 2004, elevou-se para 165 toneladas, representando um percentual de aumento da ordem de 2.062% (PIAUI, 2004).

Muitos estudos relatam que trabalhadores de pequenas culturas, também se expõem aos vários agrotóxicos (FARIA *et al.*, 2004; CASTRO; GOMES, 2007; ARAÚJO *et al.*, 2007). Os resultados do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos - PARA, idealizado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e executado em parceria pelos Estados da Federação, comprovam a utilização ilegal de agrotóxicos em culturas onde geralmente ocorrem índices elevados de exposição de pequenos e médios produtores a essas substâncias por utilizarem, em sua grande maioria, pulverizadores costais (ANVISA, 2009). Esta informação é relevante, uma vez que a agricultura familiar tem uma participação bastante representativa na agricultura brasileira, correspondendo a 84,4% dos estabelecimentos rurais do país (IBGE, 2006).

No Estado do Piauí, do total das pessoas de 10 anos ou mais de idade, ocupadas na semana de referência, 42% tinham a atividade agrícola como trabalho principal (IBGE, 2007). A crescente utilização de agrotóxicos, verificada pelos órgãos oficiais, através do controle da revenda dos agrotóxicos e os resultados do censo agropecuário, mostra que, do total de estabelecimentos que utilizam essas substâncias, 90,9% não recebeu orientação técnica, 87% usa pulverizador costal, e, 48,6% são associados a entidades de classe (sindicatos, associações/movimentos de produtores e moradores) (IBGE, 2006). Segundo dados coletados pela Agência de Defesa Agropecuária do Piauí (ADAPI), nas empresas registradas que

comercializam agrotóxicos, no ano de 2009, no Piauí foram consumidos, produtos que se apresentam na forma de pó (Kg) e na forma líquida (l), conforme **Tabela 1**.

Tabela 1. Classe dos agrotóxicos mais comercializados no Estado do Piauí, ano 2009.

CLASSES DE AGROTÓXICOS	QUANTIDADE	
	Kg	L
Herbicidas	24.068	237.381
Inseticidas,	1.075	106.375
Fungicida	2.281	77.815
Total	27.424	421.571

Fonte: PIAUÍ- ADAPI, 2009.

Um estudo realizado pelo Sistema Nacional de Informação Toxicológica (SINITOX) informou que no Nordeste do Brasil, os agentes tóxicos que mais registraram crescimento foram os de uso agrícola, com uma alta de 164 %. Como agravante, há o fato de que os agricultores da região não estão preparados para lidar com esses agentes tóxicos de alta letalidade, pois têm baixa escolaridade, más condições de trabalho e não recebem orientações. Avaliando os dados do SINITOX e o Sistema de Agravos Notificáveis (SINAN), órgão do Ministério da Saúde, que registra casos de intoxicação por agrotóxicos existentes no SUS revela poucos casos de intoxicação no Nordeste do Brasil, o que leva vários autores a concordar que o registro de acidentes com trabalhadores expostos a agro-químicos é subestimado, sendo, portanto, diversos casos de acidentes com agrotóxicos deixados de ser registrados nos serviços de vigilância em saúde do SUS (SINITOX, 2007).

O Sinitox registrou no ano de 2007, 14.711 casos de intoxicação por agrotóxicos, destes 11,9% (1.758) de origem ocupacional. Do total dos casos registrados no Brasil, 1.863 (12,7%) foram no Nordeste, e apenas 27 casos foram notificados no Piauí (BRASIL, 2009). Os dados do Sinan mostram que em 2008, no Brasil, foram feitas 5.295 notificações de intoxicação por agrotóxico, destas, apenas 1.137 foram registradas como decorrentes do trabalho. Neste sistema, dos 1.051 casos notificados no Nordeste, foram 24 no Piauí (BRASIL, 2009).

Os agrotóxicos são usados mundialmente na agricultura para proteger as culturas, e em controles de doenças importantes para a Saúde Pública. Entretanto as exposições a estas substâncias representam um risco em potencial para a saúde humana, mas também representam toxicidade em exposição ocupacional e não ocupacional especialmente devido suas propriedades genotóxicas. Em estudos usando a frequência de aberrações cromossômicas (AC), teste de cromátides irmãs em linfócitos de sangue periférico, micronúcleos (MN) em células epiteliais de mucosa bucal, frequência de MN, anormalidades nucleares (cariorrexe (CR), cariólise (CL), brotos e células binucleadas (BN)) encontraram-se aumentadas em indivíduos expostos aos agrotóxicos, especialmente para os fumantes, em relação aos indivíduos não expostos (ERGENE *et al.*, 2007).

A Agência Internacional de Investigação de Câncer (IARC) revisou o potencial carcinogênico de uma grande variedade de inseticidas, fungicidas, herbicidas e outros compostos semelhantes. O uso desses produtos químicos sem proteção necessária pode levar a alteração no material genético e ao possível desenvolvimento de alguns tipos de tumores. A exposição ocupacional a agrotóxicos tem sido associada com várias doenças neoplásicas (IARC, 2002).

Conforme os dados mais recentes levantados pela OMS, o câncer será a primeira causa de mortalidade no mundo nas próximas décadas, sendo a segunda causa de morte por doença no Brasil. Associado a este fato, o câncer possui um forte impacto na sociedade, debilitando indivíduos produtivos, tanto no âmbito social e no econômico, além de constituir sério problema de Saúde Pública (ALMEIDA *et al.*, 2005).

As estatísticas mundiais mostram que no ano 2000, ocorreram 5,3 milhões de casos novos de câncer em homens e 4,7 milhões em mulheres, e que 6,2 milhões de pessoas morreram por essa causa (3,5 milhões de homens e 2,7 milhões de mulheres), correspondendo a 12% do total de mortes por todas as causas (cerca de 56 milhões). Em 2005, de um total de 58 milhões de mortes ocorridas no mundo, o câncer foi responsável por 7,6 milhões, o que representou 13% de todas as mortes. Do total de óbitos por câncer ocorridos em 2005, mais de 70% ocorreram em países de média ou baixa renda (WHO, 2006).

Estima-se que em 2020 o número de casos novos anuais seja da ordem de 15 milhões. Cerca de 60% destes novos casos ocorrerão em países em desenvolvimento. É também conhecido que pelo menos um terço dos casos novos de câncer que ocorrem anualmente no mundo, poderia ser prevenido. Resultados de numerosas pesquisas demonstraram que existem medidas efetivas de prevenção primária e secundária que podem reduzir substancialmente o número de casos novos de câncer e prevenir muitas mortes atribuídas à doença. Para reduzir o impacto do câncer, é necessário que se reduza, primeiramente, a prevalência dos fatores comportamentais e ambientais que aumentam seu risco. Também, devem assegurar que programas de rastreamento e protocolos de tratamento baseados em evidência estejam acessíveis, particularmente nas populações menos assistidas pelos serviços de saúde (BRASIL, 2001).

Estudos de biomarcadores humanos podem ser potencialmente usados para identificar os possíveis fatores de susceptibilidade a carcinogênese. Mudanças citogenéticas, expressão de genes e perfil epigenético podem ser usados para determinar *status* para químicos conhecidos como carcinógenos. Agentes químicos com resultados positivos em testes padrões de genotoxicidade são geralmente conhecidos por induzir o câncer via modo genotóxico e/ou mutagênico, que é um indicativo de riscos humanos (DEARFIELD; MOORE, 2005; CIMINO, 2006).

Dessa forma, os agrotóxicos em nosso ambiente podem causar uma variedade de efeitos sobre a saúde humana, onde alguns deles se expressam imediatamente, enquanto outros levam anos para se manifestar. Efeitos tardios bem conhecidos incluem a indução do câncer, doenças genéticas nas gerações seguintes, entre outros. Os agrotóxicos organofosforados têm sido usados por várias décadas na agricultura, medicina e como agente químico em muitas práticas. Entretanto, a presença deles no meio ambiente pode trazer riscos à saúde humana (ROGERS *et al.*, 1999).

A exposição humana aos agrotóxicos no meio ambiente e em alimentos acontece por contato direto e indireto, por diferentes rotas tais como: inalação, ingestão e contato dérmico, ocasionando problemas agudos e crônicos à saúde, especialmente a do agricultor, com relatos da incidência de câncer, doenças

crônicas, problemas de esterilidade, desordens endócrinas, neurológicas e comportamentais (REKHA *et al.*, 2006; ABHILASH; SINGH, 2009), assim como o aumento de linfomas (ZHENG *et al.*, 2001), mielomas (KHUDER; MUTGI, 1997), sarcomas e câncer de pâncreas, fígado, bexiga (SHUKLA *et al.*, 2001; JI *et al.*, 2001) e doença de Parkinson (GAUTHIER *et al.*, 2001). A exposição em grandes doses por um curto período causa os chamados efeitos agudos, bastante descritos na literatura médica, cuja relação causa/efeito é de fácil identificação. A intoxicação aguda varia de intensidade leve até grave, podendo ser caracterizado por náusea, vômito, cefaléia, tontura, desorientação, hiperexcitabilidade, parestesias, irritação de pele e mucosas, fasciculação muscular, dificuldade respiratória, hemorragia, convulsões, coma e morte (GARCIA, 1996; SILVA, 2000).

As intoxicações provocadas por agrotóxicos são classificadas em três tipos: (1) intoxicações agudas - que ocorrem após intensa exposição, em breve período de tempo, a substâncias de extrema ou alta toxicidade (Classes I e II). Os sintomas são nítidos, aparecem rapidamente e, dependendo da quantidade de veneno absorvido, determinam a gravidade da intoxicação; (2) intoxicações subagudas - que aparecem mais lentamente, traduzindo-se através de sintomas subjetivos e vagos (fraqueza, mal-estar, dor de cabeça, sonolência etc.) e ocorrem devido à exposição a produtos altamente ou moderadamente tóxicos (Classes II e III); (3) intoxicações crônicas - que ocorrem tardiamente, após meses ou anos de pequena ou média exposição a um produto tóxico ou a uma diversidade de substâncias, apresentando um quadro clínico indefinido, que dificulta o estabelecimento donexo causal para as doenças ocupacionais (OPAS/OMS, 1996).

Os principais efeitos agudos e crônicos causados pela exposição aos agrotóxicos, de acordo com a praga que controlam e o grupo químico a que pertencem estão apresentados na **Tabela 2**.

Tabela 2. Efeitos dos agrotóxicos na saúde humana.

CLASSE AÇÃO	GRUPO QUÍMICO	SINTOMAS DE INTOXICAÇÃO AGUDA	SINTOMAS DE INTOXICAÇÃO CRÔNICA
Inseticidas	Organofosforados e Carbamatos	Fraqueza, cólicas abdominais, vômitos, espasmos musculares e convulsões	Efeitos neurotóxicos, retardados, alterações cromossômicas e dermatites de contato
	Organoclorados	Náuseas, vômitos e contrações musculares involuntárias	Lesões hepáticas, arritmias cardíacas, lesões renais e neuropatias periféricas
	Piretróides Sintéticos	Irritações das conjuntivas; espirros, excitação e convulsões	Alergias, asma brônquica, irritações nas mucosas e hipersensibilidade
Fungicidas	Ditiocarbamatos	Tonteiras, vômitos, tremores musculares e dor de cabeça	Alergias respiratórias, dermatites, mal de Parkinson e cânceres
	Fentalamidas	--	Teratogêneses
Herbicidas	Dinitrofenóis e Pentaclorofenol	Dificuldade respiratória, hipertermia e convulsões	Cânceres (PCP – formação de dioxinas) e cloroacnes
	Fenoxiacéticos	Perda do apetite, enjôo, vômitos e fasciculação muscular	Indução da produção de enzimas hepáticas, cânceres e teratogênese
	Glicina substituída	Irritação nos olhos e pele, dor de cabeça, náuseas, entorpecimento, elevação da pressão arterial, palpitações e alergias.	Lesões em glândulas salivares, inflamações nas mucosas do estômago, danos genéticos (em células sanguíneas do corpo humano), e outros.
	Dipiridilos	Sangramento nasal, fraqueza, desmaios e conjuntivites	Lesões hepáticas, dermatites de contato e fibrose pulmonar

Fonte: Adaptada de Peres e Moreira (2003) e Guterres (2003)

As exposições por longos períodos e em baixas concentrações, os chamados efeitos crônicos, são de reconhecimento clínico bem mais difícil, principalmente quando há exposição a múltiplos contaminantes, situação bastante comum no trabalho agrícola. Há, neste caso, maior dificuldade para o reconhecimento de uma associação causa/efeito. Entre os inúmeros efeitos crônicos sobre a saúde humana são descritas alterações imunológicas, genéticas, malformações congênitas, câncer, efeitos deletérios sobre o sistema nervoso, hematopoiético, respiratório, cardiovascular, geniturinário, trato gastrintestinal, hepático, reprodutivo, endócrino, pele e olhos, além de reações alérgicas a estas drogas, alterações comportamentais (BRASIL, 1997; ALAVANJA *et al.*, 2004).

Os agrotóxicos são reportados em muitos estudos como responsáveis por vários efeitos adversos na saúde humana, incluindo além das intoxicações agudas, efeitos imune, nervosos, endócrinos e no sistema reprodutivo (RITZ e YU, 2000) os danos ao DNA também têm sido relatados (BOLOGNESI, 2002). Esses compostos interagem com o DNA, causam doenças degenerativas e ultimamente pode levar ao câncer, na ausência de processos de reparação de DNA (UNDEGER; BASARAN, 2002; JAGA; DHARMANI, 2005). Os organismos respondem à ação de agentes genotóxicos por reparo livre de erros e sujeito aos erros, morte celular por citotoxicidade e/ou por apoptose e por modulação do controle do ciclo celular (MOUSTACCHI, 2000; JAGETIA *et al.*, 2001).

Dados experimentais revelam que vários agroquímicos induzem mutações, alterações nos cromossomos e danos ao DNA. O biomonitoramento dos riscos de instabilidades genéticas ocasionadas por misturas complexas de químicos em trabalhadores expostos ocupacionalmente constitui uma estratégia preventiva do câncer (BOLOGNESI, 2003).

1.2 Mecanismo de Ação dos Agrotóxicos

Os inseticidas são compostos quimicamente diferenciados, que podem ser agrupados em quatro categorias principais: os organoclorados, os piretróides, os organofosforados e os carbamatos (KLAASSEN, 1999). O principal mecanismo de ação dos inseticidas é sobre o sistema nervoso dos insetos, mas este efeito não se restringe à espécie-alvo e pode afetar também os mamíferos. A ação dos inseticidas se dá pela inibição de enzimas colinesterases, especialmente a AChE, levando a um acúmulo de acetilcolina nas sinapses nervosas, desencadeando uma série de efeitos nicotínicos, muscarínicos e do sistema nervoso central (SNC). Diferentemente dos organofosforados, os carbamatos são inibidores reversíveis das colinesterases, porém as intoxicações podem ser igualmente graves. Ambos atuam no SNC, nos glóbulos vermelhos, no plasma e em outros órgãos. Não se acumulam no organismo, mas é possível ocorrer o acúmulo de efeitos. Efeitos neurotóxicos retardados podem ocorrer com certos organofosforados (SILVA, 2005). A exposição crônica a este tipo de produto está relacionada, entre outros, ao câncer, efeitos

teratogênicos, neuropatias periféricas tardias e toxicidade reprodutiva (CALDAS; SOUZA, 2000).

Os organofosforados são compostos formados por ésteres amido ou tiol-derivados dos ácidos fosfóricos, fosfônicos, fosforotióicos e fosfonotióicos. Possuem boas propriedades de solubilidade em lipídeos, além de fácil distribuição pelos tecidos orgânicos. Os carbamatos são formados por derivados dos ácidos N-metil-carbâmicos, dos ácidos tiocarbamatos e ditiocarbamatos, que com exceção dos dois últimos, tem ação principal sobre as enzimas esterases. As concentrações dos carbamatos são maiores nos tecidos envolvidos com a biotransformação dos xenobióticos (ALONZO; CORRÊIA, 2008). Esses compostos são os dois agentes mais utilizados no combate as pragas agrícolas, sendo os primeiros, absorvidos pelo organismo humano, através da via dérmica, trato gastrointestinal, via respiratória e membranas mucosas, e os carbamatos, utilizados como inseticidas agrícolas e na jardinagem, tem toxicidade excepcionalmente, baixa em relação à absorção dérmica e, especialmente, quando encontrados em formulações sólidas são pouco absorvidos pelo organismo humano. Geralmente, os agricultores desenvolvem as atividades de preparo e aplicação dos agrotóxicos numa situação em que estão presentes, ao mesmo tempo, vários fatores: misturas de agrotóxicos, esforço físico e temperaturas elevadas (LARINI, 1997; GILMAN, 2006).

De forma similar aos organofosforados, o processo de inibição enzimática desencadeado pelos carbamatos ocorre pela fixação dos ésteres de ácido carbâmico nos sítios reativos da acetilcolinesterase. Entretanto, este processo tem dois estágios: o primeiro, de inibição da enzima, e o segundo, de descarboxilação da enzima, ativando-a novamente. Portanto, os carbamatos são considerados inibidores reversíveis da acetilcolinesterase. Os organofosforados e os carbamatos são capazes de ultrapassar as barreiras hematoencefálica e placentárias (ECOBICHON, 1996). Os agrotóxicos inibidores da colinesterase são biotransformados por enzimas oxidases, hidrolases e transferase, ocorrendo no fígado principalmente por hidrólise, oxidação e conjugação com a glutatona. Após absorção são rápida e amplamente distribuídos para vários tecidos e órgãos atingindo concentrações maiores em fígado e rins. Alguns organofosforados altamente lipofílicos depositam no tecido adiposo e são liberados gradualmente após

a exposição. Já os carbamatos não se acumulam no organismo (ALONZO; CORRÊIA, 2008).

Os inseticidas piretróides agem a nível dos receptores dos canais de sódio das membranas das células nervosas, resultando em despolarização da membrana, consequentemente na hiperexcitabilidade nervosa. A toxicidade dos piretróides, de um modo geral, para os mamíferos é baixa, aparentemente devido a sua rápida biotransformação pelas esterases e enzimas microssomais hepáticas. A toxicidade é alta por via intravenosa, moderada a leve por absorção oral e insignificante por absorção cutânea. A toxicidade dos produtos que contém piretróides é devido a outros ingredientes contidos na preparação, usualmente solventes, derivados de petróleo. São bem absorvidos pelo trato gastrintestinal e muito pouco pela pele intacta podendo, ainda, ser absorvidos por via inalatória. Uma vez absorvidos, são rapidamente metabolizados no fígado através de reações de oxidação e hidrólise de ésteres. A biotransformação resulta na formação de compostos mais polares. Seus metabólitos são excretados, lentamente, através da bile e da urina, podendo permanecer detectável nos tecidos corporais por até três semanas após a ingestão (CALDAS, 2000).

Os inseticidas neonicotinóides são compostos que tiveram origem na molécula de nicotina, recentemente registrado no Brasil para o controle de pragas em várias culturas, pouco tóxico, contudo perigoso para o ambiente. A toxicidade deve-se a uma ação de agonismo e afinidade de ligação entre os neonicotinóides e os receptores da acetilcolina dos vertebrados, sendo o cérebro o primeiro alvo. Estes inseticidas (imidacloprid, thiamethoxam, etc.) mimetizam a ação da acetilcolina e não são degradados pela acetilcolinesterase. Assim, eles se encaixam no receptor da acetilcolina na membrana das células pós-sinápticas, abrindo canais de Na^+ na mesma, com conseqüente hiperatividade nervosa, seguido de colapso do sistema nervoso. Os mecanismos envolvidos na transmissão de impulsos nervosos em insetos são muito semelhantes àqueles operantes em mamíferos, aves e peixes. Por isso, muitos inseticidas neurotóxicos são tóxicos também a esses organismos não alvos, incluindo os seres humanos (KAGABU, 1997; CARVALHO, 2010).

Os herbicidas são compostos químicos usados para combater as ervas daninhas nativas do ambiente nordestino. O herbicida pode continuar presente em alimentos num período de até dois anos após o contato com o produto e em solos por mais de três anos, dependendo do tipo de solo e clima. Como o produto possui uma alta solubilidade em água, sua degradação inicial é rápida, seguida, porém, de uma degradação lenta. Suas moléculas foram encontradas tanto em águas superficiais como subterrâneas. O glifosato é um dos tipos de herbicida e seu efeito no organismo humano é cumulativo e a intensidade da intoxicação depende do tempo de contato com o produto. Os sintomas de intoxicação previstos incluem irritações na pele e nos olhos, náuseas e tonturas, edema pulmonar, queda da pressão sangüínea, alergias, dor abdominal, perda de líquido gastrointestinal, vômito, desmaios, destruição de glóbulos vermelhos no sangue e danos no sistema renal (ANDRIOLI, 2005).

Na planta o glifosato age através do bloqueio da enzima 5-enolpiruvato-shiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS), que faz parte da via de biossíntese de aminoácidos aromáticos essenciais (fenilalanina, tiroxina e triptofano), os quais são precursores de outros produtos, como lignina, alcalóides, flavonóides e ácidos benzóicos. Quando essa enzima é bloqueada, a via metabólica é interrompida e, pela falta de aminoácidos, a planta morre (COUTINHO; MAZO, 2005). Esta via para a biossíntese de aminoácidos aromáticos não é expressa por nenhum membro do reino animal, tornando esse mecanismo de ação exclusivo às plantas (ROMANO et al., 2008).

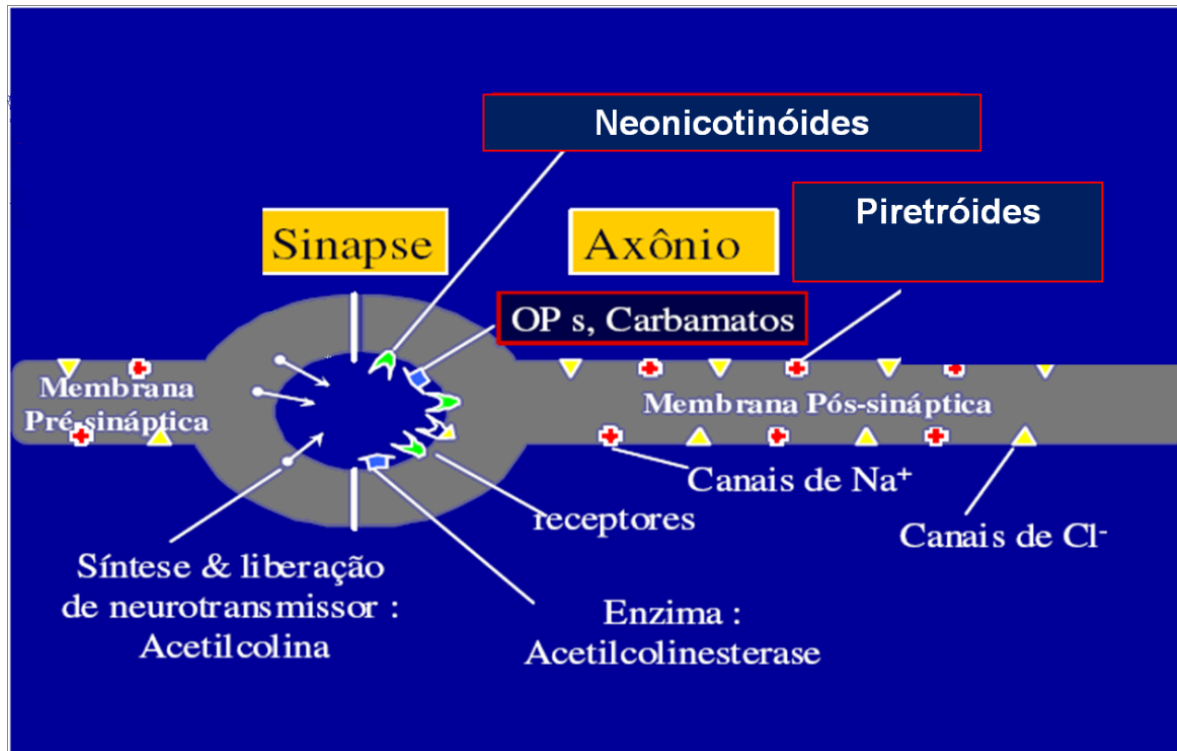


Figura 1: Mecanismo de Ação dos Agrotóxicos

Disponível: www.fag.edu.br/.../MODO%20AÇÃO%20INSETICIDAS%201%20PDF.pdf.
Acessado em 22-06-2011.

1.3 Instabilidade Genética

A instabilidade genética tem sua origem a partir de uma cascata de mutações que ocasionam numerosas modificações na estrutura do DNA, tais como quebras simples ou duplas, deleções ou modificações de bases, pontes de DNA-DNA ou DNA-proteínas e pontes intercadeias (SAFFI; HENRIQUES, 2003). Esses são alguns eventos iniciais pelos quais os agentes genotóxicos químicos e físicos ocasionam doenças hereditárias, cânceres e letalidades (SETLOW, 2001). Vários estudos epidemiológicos relatam que, em sua maioria, os cânceres são originados pela exposição contínua a agentes mutagênicos e carcinogênicos, sendo que a susceptibilidade individual pode depender da predisposição genética, de diferenças no hábito nutricional e no estilo de vida (ROBERTS, 1997).

Alterações na dinâmica do genoma são indicativos de câncer, as quais refletem em mutações que acometem genes importantes para manutenção celular, produzindo ganho (oncogene) ou perda de função (genes supressores tumorais). Várias evidências indicam que a tumorigênese em humanos é um processo que

envolve vários passos e que esses refletem em alterações genéticas que guiam a progressiva transformação de células humanas. Algumas alterações como sinais de crescimento autossuficientes, não sensibilidade a inibidores de crescimento, perda da morte celular programada (apoptose), potencial replicativo sem limite, angiogênese sustentada, invasão tecidual e metástase, são essenciais e podem explicar a grande diversidade de cânceres e tumores, as quais determinariam o crescimento maligno (HANAHAN; WEINBERG, 2000).

As mutações são detectadas freqüentemente através da expressão fenotípica, causada por uma mudança súbita e hereditária no genótipo de um organismo, alterando suas características. A ocorrência de mutações, no entanto, depende da natureza da lesão e das respostas celulares aos danos no DNA. Basicamente, as mutações são divididas em duas grandes categorias: mutações gênicas e cromossômicas. As primeiras são alterações que ocorrem na seqüência de nucleotídeos do DNA, ou por substituição de bases, ou ainda adição ou deleção de nucleotídeos; e as segundas, são as que produzem alterações no número ou na estrutura dos cromossomos, e são detectadas por análises citogenéticas celular. As mutações podem ocorrer em qualquer célula, tanto em células de linhagem germinativa como em célula somática (RIBEIRO *et al.*, 2003).

Os agentes que mudam a seqüência do DNA são “tóxicos” para o gene e são, então, chamados de genotóxicos, que leva a uma alteração herdável da função gênica. O aparecimento de mutações ocorre em todos os seres vivos, sendo um processo fundamental para a evolução e diversidade das espécies, mas pode ocorrer uma série de problemas, podendo apresentar na maioria das vezes resultados maléficos, incluindo malformação, câncer, envelhecimento e morte. A probabilidade de uma mutação ser vantajosa pode ser difícil, mas existe (MALUF; ERDTMANN, 2003).

No decorrer da vida, o DNA sofre alterações, que podem ser causadas por erros durante a replicação do DNA, na divisão celular. No entanto, a justificativa da preocupação da exposição a agentes químicos ambientais, é que a exposição adicional representa um aumento na carga mutagênica, e que todo risco em excesso precisa ser identificado e se possível minimizado. A **Tabela 3** relaciona algumas das

fontes, em potencial, de exposição humana a agentes mutagênicos (RIBEIRO; MARQUES, 2003).

Tabela 3. Fontes de exposição humana a agentes mutagênicos.

Tipo	Exemplos
Endógena	Óxido nítrico Radicais livres Formação de nitrosaminas endógenas
Biológico	Mutágenos originados de infecção crônica por vírus, bactéria ou parasitas
Dieta	Mutágenos naturais presentes na dieta Mutágenos gerados durante o cozimento dos alimentos Mutágenos gerados no processo de preservação de alimentos
Radiação	Exposição médica – raios-X para diagnóstico e radioterapia Exposição ao lixo nuclear Radiação UV
Poluição	Efluentes industriais Subprodutos da cloração da água Emissões por motores de veículos Agrotóxicos usados na agricultura Incineração de lixo
Ocupacional	Produtos petroquímicos Produção de energia nuclear Produção de ferro e aço Agentes quimioterápicos

Fonte: Adaptada de Ribeiro e Marques (2003).

1.4 Biomonitoramento Ocupacional da População

É crescente a preocupação sobre o efeito mutagênico e carcinogênico de agentes genotóxicos em populações expostas ocupacionalmente, acidentalmente ou por estilo de vida. Para a saúde do trabalhador é fundamental conhecer os riscos existentes nos processos de trabalho, onde ocorre exposição a produtos químicos, considerando o risco das intoxicações. Torna-se necessário conhecer as substâncias químicas, com o objetivo de prevenir ou minimizar a incidência de mortes ou doenças decorrentes da interação destes produtos com o organismo humano. A avaliação da exposição pode ser feita pela medida da concentração do agente químico em amostras ambientais, como o ar (monitorização ambiental) ou através da medida de parâmetros biológicos (monitorização biológica), que são denominados indicadores biológicos ou biomarcadores. Os biomarcadores têm sido categorizados em três tipos principais: de exposição, de suscetibilidade e de resposta ou efeito (AMORIM, 2003).

Os biomarcadores de exposição ou dose interna correspondem à expressão de um agente ambiental ou de seus metabólitos no meio interno dos indivíduos. Estes consistem em medidas quantitativas de substâncias químicas ou de seus metabólitos em fluídos biológicos ou a medida de uma alteração bioquímica precoce e reversível em fluídos biológicos que reflita a exposição (AMORIM, 2003). O ensaio cometa tem sido utilizado como um marcador de exposição importante (VILLELA *et al.*, 2003; MALUF; ERDTMAN, 2003).

O biomarcador de efeito é um parâmetro biológico, medido no organismo, o qual reflete a interação da substância química com os receptores biológicos. Na prática diária, biomarcadores de efeito são usados para confirmar um diagnóstico clínico. Mas, para a prevenção, um biomarcador de efeito considerado ideal, é aquele que mede uma alteração biológica em um estágio ainda reversível (ou precoce), quando ainda não representa agravo à saúde (RÜDIGER, 1999). Por princípio os indicadores de efeito servem para avaliar as conseqüências e, indiretamente, a intensidade da exposição, ou seja, no momento em que os valores destas análises se distanciam dos valores estabelecidos como normais representam o desfecho de um processo de exposição (PERES *et al.*, 2005). Dentre os

biomarcadores de efeito relacionado à exposição a agrotóxicos, o mais utilizado é o das colinesterases sanguíneas (OMS, 1996; OLIVEIRA-SILVA *et al.* 2001). Os biomarcadores de efeito ou de resposta indicam alterações presentes em tumores; são tardios e permitem avaliar o prognóstico da doença. Os mais utilizados são as aberrações cromossômicas, troca de cromátides irmãs e micronúcleo.

Os biomarcadores de susceptibilidade podem refletir fatores genéticos ou adquiridos que influenciam na resposta do organismo a uma determinada exposição química, indicam ainda quais os fatores podem aumentar ou diminuir um risco individual no desenvolvimento da resposta do organismo decorrente da exposição a agentes químicos ambientais. Entre os biomarcadores de susceptibilidade podemos citar a Glutathione-S-transferase, Paroxonase (AMORIM, 2003). Na **Figura 2**, formula-se a apresentação sucinta desses biomarcadores, segundo Farmer e Singh (2008).

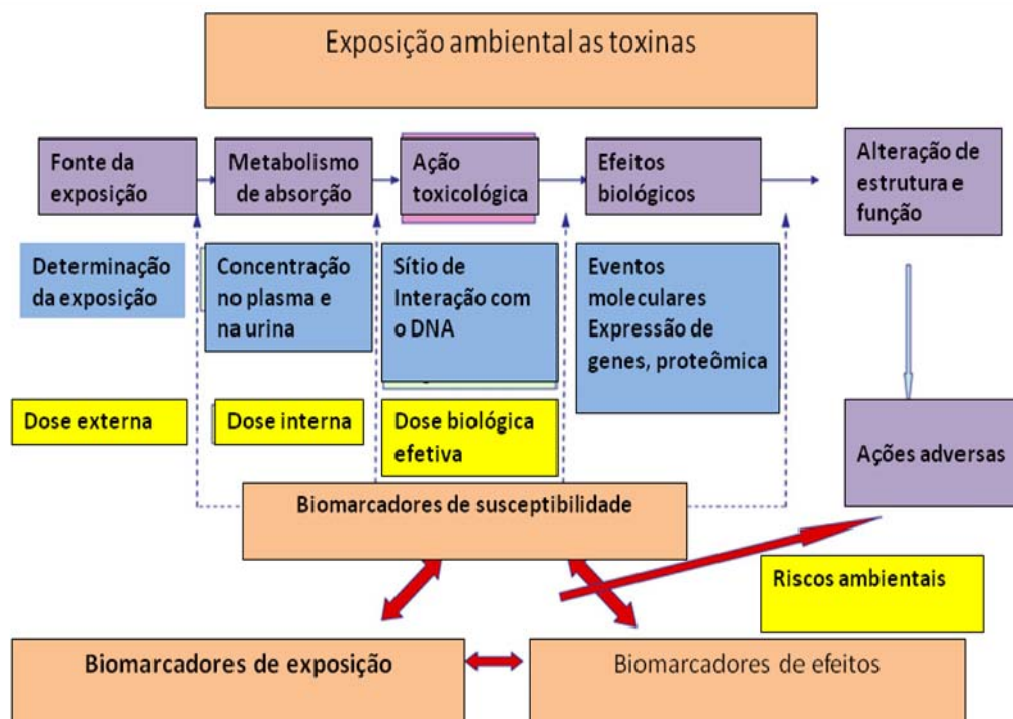


Figura 2 Caracterização dos biomarcadores da exposição ambiental as toxinas.

Fonte: Adaptada de Farmer e Singh, 2008.

A exposição a agentes genotóxicos em nosso ambiente pode causar uma variedade de efeitos sobre a saúde humana. Alguns deles se expressam imediatamente, enquanto outros levam anos para se manifestar. Efeitos tardios bem conhecidos incluem a indução do câncer, doenças genéticas nas gerações seguintes, entre outros. Em muitos casos os danos ao DNA são oriundos de fontes exógenas de genotóxicos ambientais ou ocupacionais tais como os compostos alquilantes, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, bifenóis, aminas heterocíclicas, radiações ionizantes, radiações ultravioletas (UV). O DNA também é o alvo de drogas metabólicas que reagem diretamente com o DNA ou indiretamente com a incorporação de nucleotídeos análogos, ou bloqueando funções metabólicas do DNA tais como as DNA polimerases e topoisomerases. Duas estratégias estão envolvidas nas respostas aos danos ao DNA: os danos são reparados ou tolerados, ou as células são removidas por apoptose. O não reparo leva as consequências tais como: aberrações cromossômicas, mutações em genes e transformações malignas (KULTZ, 2005).

Estudos de exposição ocupacional a agentes genotóxicos são mais frequentes em populações expostas ao ferro em fundições (PERERA *et al.*, 1993) em fornos de carvão (BRESCHIA *et al.*, 1999), alumínio (SCHOKET *et al.*, 2001), trabalhadores de oficinas automotivas (MELIKIAN *et al.*, 1999) motoristas de ônibus (SINGH *et al.*, 2007), trabalhadores em asfaltos (BINKOVA *et al.*, 2007) policiais (HAYES *et al.*, 2001), soldadores, trabalhadores de indústrias de plásticos e sujeitos expostos aos epicloritos (LANDIN *et al.*, 1997), derivados de benzidina (ZHOU *et al.*, 1997) e aos herbicidas (BOOGAARD *et al.*, 1994).

O biomonitoramento da exposição ocupacional a agentes mutagênicos vem sendo atualmente considerado um dos mecanismos de prevenção e controle de doenças genéticas. Os biomarcadores de genotoxicidade, mutagenicidade e carcinogenicidade são importantes para a avaliação de efeitos crônicos de químicos mutagênicos e carcinogênicos (SAFFI; HENRIQUES, 2003).

Diante do exposto o uso dos biomarcadores de genotoxicidade e mutagenicidade é importante para o diagnóstico de danos ao DNA, como prevenção de riscos em longo prazo da exposição. Entretanto, os estudos da relação da saúde

humana e das substâncias químicas, devido às complexas funções hepáticas e renais encontram-se relacionadas com a síntese da maioria das proteínas plasmáticas e pelo fato de pertencerem ao metabolismo de importantes órgãos do corpo humano também se constitui como um parâmetro de análise laboratorial indicativo de toxicidade. Ressalta-se ainda a importância do hemograma como o exame mais solicitado pelos clínicos e conseqüentemente o mais realizado por ser exame de triagem para inúmeras alterações e acompanhamento do paciente, pois, de certa forma, reflete a saúde do indivíduo (HENRY,2008).

1.4.1 Biomarcadores hematológicos e bioquímicos

O hemograma é coadjuvante indispensável no diagnóstico e no controle evolutivo das doenças infecciosas e crônicas em geral, das emergências médicas, cirurgias e traumatologias, acompanhamento da quimioterapia e da radioterapia e nas intoxicações agudas ou crônicas das substâncias químicas, relacionando-se com toda a patologia (LIMA *et al.*, 1977).

Segundo Oliveira (2007), o hemograma corresponde a um conjunto de testes laboratoriais que estabelece os aspectos quantitativos e qualitativos dos eritrócitos (eritrograma), dos leucócitos (leucograma) e das plaquetas (plaquetograma) no sangue: I - Eritrograma: inclui os testes laboratoriais que determinam o perfil hematológico da série vermelha no sangue periférico, É constituído por: contagem de eritrócitos ou hemácias (Hm); dosagem da hemoglobina (Hb); hematócrito (Ht); índices hematimétricos: volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM); e avaliação da morfologia eritrocitária. II - Leucograma: engloba os testes laboratoriais que determinam o perfil hematológico da série branca (leucócitos) no sangue periférico. É constituído da contagem global e da contagem diferencial de leucócitos, incluindo a análise das respectivas alterações hematológicas no sangue. É expresso no resultado pela forma leucocitária (com valores relativos e absolutos) de cada subtipo leucocitário. III - Plaquetograma: envolve a contagem de plaquetas, a avaliação da sua morfologia feita por microscopia e as determinações do volume plaquetário (VPM) e da variação entre os seus volumes (PDW).

O hemograma é o principal exame a ser realizado quando há suspeita de anemia. A anemia é considerada a doença mais prevalente em todo o mundo, especialmente 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 diminuição dos níveis de hemoglobina no sangue, com ou sem diminuição do número de eritrócitos, de acordo com idade, sexo e altitude, para indivíduos normovolêmicos. A morfologia anormal das hemácias pode sugerir um diagnóstico, podendo as anemias, serem classificadas de acordo com o tamanho das hemácias, inferido através do VCM. Assim, é possível classificar como anemia normocítica aquelas que estão dentro do valor de normalidade do VCM, microcíticas aquelas abaixo e macrocíticas acima, intimamente ligados a esses valores anormais estão as deficiências de ferro e folato, alcoolismo e certas medicações como metotrexato respectivamente. Nas anemias consideradas normocíticas podem estar relacionadas às anemias aplásticas e secundárias a agressões medulares (RAMOS, 2009).

Dentre as inúmeras moléculas presentes no organismo algumas são de grande importância pela possibilidade de detecção de alterações patológicas quando encontradas em valores elevados ou diminuídos no sangue. Estes analitos são quantificados através de reações enzimáticas ou químicas. Na avaliação bioquímica de trabalhadores expostos a contaminantes ambientais, inúmeros parâmetros bioquímicos, podem ser avaliados, tais como creatinina, uréia, aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase, gama GT e butirilcolinesterase (RAMOS, 2009).

A formação e excreção da creatinina fazem dela um marcador muito útil da função renal, principalmente da filtração glomerular, sendo o teste mais utilizado para esta finalidade. É o produto de degradação da creatina, sendo sua concentração sérica não só dependente da taxa de filtração renal, mas também da massa muscular, idade, sexo, alimentação, concentração de glicose, piruvato, ácido úrico, proteína, bilirrubina e do uso de medicamentos (cefalosporinas, salicilato, trimetoprim, cimetidina, hidantoína, anticoncepcionais e antiinflamatórios). Níveis baixos podem ser encontrados nos estados que cursam com diminuição da massa muscular (WALLACH, 2003).

A determinação da creatinina plasmática é um teste de função renal mais seguro do que a uréia. Nas doenças renais, a creatinina se eleva mais vagarosamente que a uréia e se reduz mais vagarosamente com a hemodiálise. Fatores extrarrenais, como insuficiência cardíaca congestiva, choque e obstrução mecânica do trato urinário, doenças musculares, medicamentos (antibióticos, ácido acetilsalicílico, anti-hipertensivos) e dietas ricas em carnes vermelhas provocam elevação da creatinina plasmática. A uréia é um produto do catabolismo de aminoácidos e proteínas. Gerada no fígado, é a principal fonte de excreção do nitrogênio do organismo. É difundida através da maioria das membranas celulares, e a sua maior parte é excretada pela urina, sendo que pequenas quantidades podem ser excretadas pelo suor e degradadas por bactérias intestinais. É livremente filtrada pelos glomérulos e é dependente da velocidade do fluxo urinário, ligado diretamente ao grau de hidratação. Grande parte da uréia filtrada é reabsorvida passivamente nos túbulos proximais. No indivíduo saudável, sua concentração varia de acordo com diferentes fatores, tais como o conteúdo protéico da dieta e a hidratação (WALLACH, 2003).

Os níveis séricos da uréia são alterados por diferentes formas de ação sobre seu metabolismo. Apesar de ser um marcador da função renal, é considerada menos eficiente do que a creatinina pelos diferentes fatores não renais que podem afetar sua concentração. No entanto, sua elevação é mais precoce, e não sofre com a variação da massa muscular. A avaliação conjunta com a creatinina é útil no diagnóstico diferencial das causas de lesão renal. Os níveis séricos diminuídos são mais raros e decorre de importante restrição da ingestão de proteínas, desidratação, reposição excessiva de líquidos, durante a gestação e nas doenças hepáticas graves por diminuição da síntese da uréia (WALLACH, 2003).

Outro marcador bioquímico de importância na avaliação dos efeitos da exposição a químicos é a enzima Aspartato Aminotransferase (AST), denominada Transaminase Oxalacética (TGO) é encontrada em diversos órgãos e tecidos como: fígado, coração, músculo esquelético e eritrócitos. Elevações das transaminases ocorrem nas hepatites (viral e tóxica), hepatite por drogas, na mononucleose, cirrose, colestase, carcinoma hepático primário ou metastático, pancreatite, traumatismo extenso e no choque prolongado. A AST está presente no citoplasma e

também nas mitocôndrias, e, portanto, sua elevação indica um comprometimento celular mais profundo. No caso do hepatócito, isso se revela por uma elevação por tempo mais prolongado no curso das hepatites virais agudas e uma elevação seletiva nos casos de hepatites alcoólicas, metástases hepáticas e necroses medicamentosas e isquêmicas. Aumentos da AST no soro são comumente encontrados no infarto agudo do miocárdio, elevando-se nas primeiras 12 horas e apresentando um pico sérico após algo em torno de 24 horas, com retorno aos valores normais em um período de 3 a 5 dias. Valores discretamente elevados podem ser encontrados também no infarto pulmonar, no infarto renal ou em casos de grandes tumores, na embolia pulmonar, distrofias musculares, dermatomiosite, traumas da musculatura esquelética, no pós-operatório, especialmente de cirurgias cardíacas, cirrose alcoólica, hepatite induzida por drogas, mononucleose infecciosa, citomegalovirose, anemias hemolíticas, pancreatite aguda e acidente vascular cerebral (HENRY, 2008).

A enzima alanina aminotransferase (ALT) era antigamente denominada transaminase pirúvica (TGP) e é encontrada abundantemente no fígado, em quantidades moderadas no rim e em pequenas quantidades no coração e na musculatura esquelética. Sua origem é predominantemente citoplasmática, fazendo com que se eleve rapidamente após a lesão hepática, tornando-a um marcador sensível da função do fígado. Como marcador hepatocelular, apresenta valores alterados em patologias que cursam com necrose do hepatócito, como hepatites virais, mononucleose, citomegalovirose e hepatites medicamentosas (HENRY, 2008).

Outra enzima para análise de toxicidade é a gama glutamiltranspeptidase ou transferase (GGT), presente nas membranas celulares e nas frações microssômicas e envolvidas no transporte de aminoácidos através da membrana celular. Está presente em ordem decrescente de abundância no túbulo proximal renal, fígado, pâncreas e intestino. Os níveis séricos da GGT são principalmente de origem hepática. Sua meia-vida é de 7 a 10 dias, aumentando para 28 dias nas lesões hepáticas ligadas ao álcool. Os valores são aproximadamente 50% mais elevados nos homens do que nas mulheres, e são diretamente proporcionais à massa corporal, ao consumo de álcool, ao fumo e ao nível de atividade física. Por

mecanismo ainda não muito bem esclarecido, pacientes com diabetes mellitus, hipertireoidismo, artrite reumatóide e doença pulmonar obstrutiva crônica freqüentemente apresentam valores aumentados de GGT. Valores muito elevados são encontrados nos quadros de colestase crônica, como na cirrose biliar primária ou na colangite esclerosante e em outras patologias hepáticas e biliares. Apresenta-se freqüentemente elevada em alcoólatras, mesmo sem hepatopatia, na obesidade e no uso de drogas como analgésicos, anticonvulsivantes, quimioterápicos, estrogênio e contraceptivos orais. Nos períodos após infarto agudo do miocárdio, a GGT pode permanecer alterada por semanas. Em estudos do gene humano, a GGT teve sua seqüência de nucleotídeos identificada (HENRY, 2008).

De forma similar, aos parâmetros anteriores, a fosfatase alcalina é uma enzima presente em praticamente todos os tecidos do organismo, especialmente nas membranas das células dos túbulos renais, ossos (osteoblastos), placenta, trato intestinal e fígado. Portanto, a fosfatase alcalina encontrada no soro é resultado da presença de diferentes isoenzimas originadas em diferentes órgãos, com predomínio das frações ósseas e hepáticas. Embora até hoje sua função ainda não esteja bem definida, a fosfatase alcalina parece estar envolvida com o transporte de lipídios no intestino e nos processos de calcificação óssea (WALLACH, 2003).

A fosfatase alcalina óssea e a hepática partilham proteínas estruturais, codificadas por um mesmo gene. Na prática clínica, a grande utilidade está na investigação de doenças hepatobiliares e nas doenças ósseas que cursam com aumento da atividade osteoblástica. É considerada um marcador importante para processos obstrutivos hepáticos. Níveis elevados podem ser também encontrados em outras lesões hepáticas ativas e nas infiltrativas com níveis mais moderados de elevação. Está aumentada nos carcinomas hepáticos primários e secundários (WALLACH, 2003).

Nas neoplasias, os níveis da fosfatase alcalina são úteis para avaliar a presença de metástases envolvendo fígado e osso. Valores muito elevados são vistos em pacientes com lesões osteoblásticas como às encontradas no carcinoma de próstata com metástase óssea. Elevações menores são vistas quando as lesões são osteolíticas, como as encontradas no carcinoma metastático de mama. Outras

condições malignas com infiltração hepática como leucemias, linfomas e sarcoma podem cursar também com elevação da fosfatase alcalina. A fosfatase alcalina em recém-nascidos e crianças, mas especialmente adolescentes, apresentam valores significativamente mais elevados do que os adultos, devido ao crescimento ósseo. Durante a fase de crescimento rápido da adolescência (estirão da puberdade), são encontrados níveis extremamente elevados. Normalmente, os valores são discretamente mais elevados em homens do que em mulheres, e essa diferença desaparece durante e após a menopausa. Em população idosa, existe uma diminuição dos níveis séricos habitualmente encontrados, como conseqüência do aumento da incidência de osteoporose nessa faixa etária. Níveis elevados em duas a três vezes podem ser encontrados durante a gravidez, especialmente no terceiro trimestre, por produção placentária. Níveis diminuídos podem ser encontrados no hipotireoidismo, na anemia perniciosa, nas hipofosfatemias e no uso de drogas como contraceptivos orais. (WALLACH, 2003).

O nível da enzima colinesterase no sangue é um valioso indicador da relação entre exposição a agrotóxico e problemas de saúde. A atividade de colinesterase é derivada da ação de duas enzimas, uma na membrana dos eritrócitos (colinesterase eritrocitária ou acetilcolinesterase – AChE) e outra sérica (colinesterase plasmática ou butiril- colinestearase – BChE). A diminuição do teor da BChE pode permanecer por trinta dias e o das hemácias por noventa dias após o último contato com os fosforados orgânicos (MARICONI, 1980). A determinação da atividade das AChE e BChE em indivíduos expostos aos inseticidas organofosforados e/ou carbamatos é utilizada também para o diagnóstico e o tratamento das intoxicações. Entretanto, não apresenta correlação muito significativa em exposições ambientais e/ou ocupacionais leves ou moderadas a estes inseticidas. Ainda assim, é considerado o indicador biológico de escolha (OMS, 1996).

É importante ressaltar que a análise da atividade das colinesterases não deve ser usada de maneira isolada, sendo útil quando usada como exame auxiliar, tanto para o diagnóstico clínico, quanto para as ações de vigilância e acompanhamento clínico, medidas gerais e de suporte são, como em todas as intoxicações agudas, imprescindíveis para salvar vidas (ALMEIDA, 2002).

1.4.2 Biomarcadores de genotoxicidade

Os biomarcadores citogenéticos, a exemplos dos MN e AC têm atraído mais atenção em inúmeros artigos, pois são potenciais indicadores de efeitos biológicos, incluindo os riscos de câncer. Existem evidências de que aumento dos níveis de AC em linfócitos de sangue periférico pode ser um marcador de risco de câncer. Outro tipo de biomarcador, os MN, também tem sido bastante usado, nos últimos anos, como um teste de genotoxicidade para avaliar quebras de cromossomos (clastogenia), perda e não disjunção (aneugenia) (KYRTOPOULOS *et al.*, 2006).

O teste de MN mensura quebras e perdas de cromossomos, como marcador de danos ao DNA, enquanto o teste de AC pode detectar alterações cromossômicas e cromatídicas ocasionadas por uma variedade de efeitos no DNA tais como deleções, duplicações, inversões e translocações e danos oxidativos. O teste Cometa detecta quebras simples e duplas do DNA, danos oxidativos e capacidade de reparo (BATTERSHILL *et al.*, 2008).

Correlações entre biomarcadores contribuem para o entendimento da complexidade molecular da exposição aos agentes genotóxicos em estudos de biomonitoramento ocupacional. Dentre os biomarcadores da exposição genotóxica em humanos incluem-se os estudos de metabólitos presentes na urina, adutos ao DNA e as proteínas e marcadores citogenéticos (FARMER e EMENY, 2006; GYORFFY *et al.*, 2008).

Foram observadas correlações entre estudos citogenéticos com o teste cometa (FAUST *et al.*, 2004). Entretanto, existem relatos de que não existem correlações entre MN, AC e Cometa (KOPPEN *et al.*, 2007). Os linfócitos isolados de sangue periférico são usados para determinar os efeitos dos mutágenos baseados em marcadores citogenéticos tais como AC, MN, quebras de cromátides irmãs e teste cometa (HOFFMANN; SPEIT, 2005).

1.4.2.1 Teste cometa em mucosa bucal e em linfócitos de sangue periférico

Nos últimos anos o monitoramento dos efeitos genotóxicos de químicos em humanos com o objetivo de avaliar os riscos tem aumentado e como resultado tem sido identificado marcadores da exposição humana a mutágenos e carcinógenos. O biomonitoramento de populações humanas expostas aos agentes potencialmente mutagênicos e carcinogênicos pode providenciar informações iniciais de desregulações celulares e iniciação do desenvolvimento de câncer. Nos recentes anos o teste do cometa, conhecido como eletroforese em gel de agarose tem sido importante biomarcador para avaliar danos em populações expostas ambientalmente ou ocupacionalmente a poluentes do ar, metais, agrotóxicos, radiações e outros xenobióticos (VALVERDE; ROJAS, 2009).

O teste cometa permite avaliar de maneira sensível a presença de lesões na fitas de DNA e, ainda, se as agressões estão sendo reparadas pela célula (VILLELA *et al.*, 2003). Este teste, com pequenas modificações no protocolo, pode avaliar danos oxidativos nas bases nitrogenadas das fitas da dupla hélice. Devido a sua sensibilidade, rapidez, baixo custo e ampla aplicação, é frequentemente empregado em estudos tanto *in vivo* como *in vitro*, podendo ser aplicado a qualquer tecido sem a limitação da proliferação celular para a análise (DEHON *et al.*, 2008).

O teste cometa teve o seu precursor desenvolvido por Östling e Johanson no ano de 1984, estes dois investigadores criaram um teste de avaliação genotóxica com células individualizadas submetida à lise e a uma corrente elétrica. Com o teste chamado na época de microgel, os investigadores eram capazes de analisar danos nas fitas do DNA, a coloração era fluorescente (GONTIJO; TICE., 2003).

A designação de teste cometa foi introduzida por Olive em 1988 devido à cauda que formava nos nucleóides lesados, mais tarde, no mesmo ano, este paralelo aos estudos de Singh viria a produzir modificações no ensaio que são usadas até hoje, criando doravante uma nova versão para o ensaio cometa, a alcalina (VALVERDE; ROJAS, 2009). Segundo Collins *et al.* (2008) o ensaio cometa é um excelente teste de genotoxicidade podendo revelar quebras simples, duplas quebras nas fitas do DNA, além de *cross-links* e sítios álcali-lábeis. Sendo

usualmente trabalhado para biomonitoramento ambiental, ocupacionais e mais recentemente para processos oxidativos do DNA, condicionados por espécies químicas de poder oxidativos extrínsecos (ingeridos na dieta) ou intrínsecos (gerado pelo processo de respiração celular) (VALVERDE; ROJAS 2009).

O ensaio cometa é uma técnica que envolve baixo custo, pequeno número de células e com boa sensibilidade pode ser empregado *in vitro* ou *in vivo* para detecção de fragmentos de DNA que migram na corrente. (HARTMANN, 2003; RIBEIRO *et al.*, 2006; DEHON *et al.*, 2008). O teste cometa (**Tabela 4**) tem aplicações na área biomédica, saúde ambiental e biomonitoramento humano a agentes tóxicos, avaliando danos ao DNA e estresse oxidativo (DUSINSKA; COLLINS, 2008).

A versão alcalina do teste usa a solução de lise e o tampão de eletroforese com um pH básico, este procedimento acaba por tornar o teste capaz de detectar lesões que não eram detectadas com a versão neutra do teste, como o sítio álcali-lábel. O pH alcalino desnatura as fitas do DNA e determinados sítios tornam se visíveis após a eletroforese e impregnação (GONTIJO; TICE, 2003).

O ensaio cometa não é um teste para avaliação de mutações, pois os danos detectados no teste podem ser recuperados pelos mecanismos de reparo celular. Este fato possibilita ao teste avaliar a capacidade de reparo em células eucarióticas (COLLINS, 2008).

Tabela 4. Uso e medidas com o teste cometa em diferentes estágios de biomonitoramento

Exposição externa	Exposição interna	Susceptibilidade individual	Efeitos	Consequências
Monitoramento do ambiente	Biodisponibilidade Metabolismo Excreção Status antioxidantes	Genótipo/fenótipo Reparo de DNA Metabolismo das enzimas de fase I/II Função imune Enzimas antioxidantes	Mutações Aberrações cromossômicas Apoptose	Doenças Morte
Contaminação ambiental e ocupacional	Quebras de DNA Danos em bases Resistência à oxidação	Capacidade de reparo Variações fenotípicas Reparo por excisão de bases Reparo por excisão de nucleotídeos	Danos oxidativos	Doenças

Fonte: Adaptada de Gyorffy, 2008.

O teste do cometa também pode ser utilizado para estudos de reparo de DNA, visto que as lesões detectadas são passíveis de correção. Embora impossibilite inferir a fidelidade do processo de reparo, pode trazer informações importantes sobre a cinética e o tipo de lesão reparada (TICE, 2000; SILVA *et al.*, 2003). A maquinaria de reparo é importante na prevenção para acumulação de danos ao DNA, e protege o organismo da incidência de câncer por excisão de nucleotídeos, de bases, e por recombinações (GILLET; SCHAERER, 2006).

Vários polimorfismos em genes de reparo, por excisão de nucleotídeos (XPD, XPG, XPC) e em reparo por excisão de bases (XRCC1, APE1, hOGG1), e em reparo de quebras duplas e por recombinação (XRCC3, NBS1) têm sido avaliados pela suas associações com genotoxicidade e risco de câncer (JIAO *et al.*, 2007). A perda de reparo devido à redução na detecção do dano ou por deficiências nos mecanismos de reparo pode ser observada em um grande número de doenças genéticas, incluindo o câncer e, o não reparo de lesões ao DNA ou o reparo incorreto pode induzir as mutações que afetam os genes responsáveis pelo controle da divisão e diferenciação celular (NASCIMENTO *et al.*, 2001).

Quando as células são expostas a agentes que lesam o DNA, genes críticos, a exemplo do gene p53 (**Figura 3**) atuam na parada do ciclo celular, promovendo um atraso para prover o tempo destinado ao reparo do dano antes da síntese replicativa do DNA. Uma disfunção nesses genes e falhas no reparo resulta na replicação de lesões mutagênicas, que, em acúmulo, favorecem as mudanças genéticas, incluindo transformações neoplásicas (MORI, 2002).

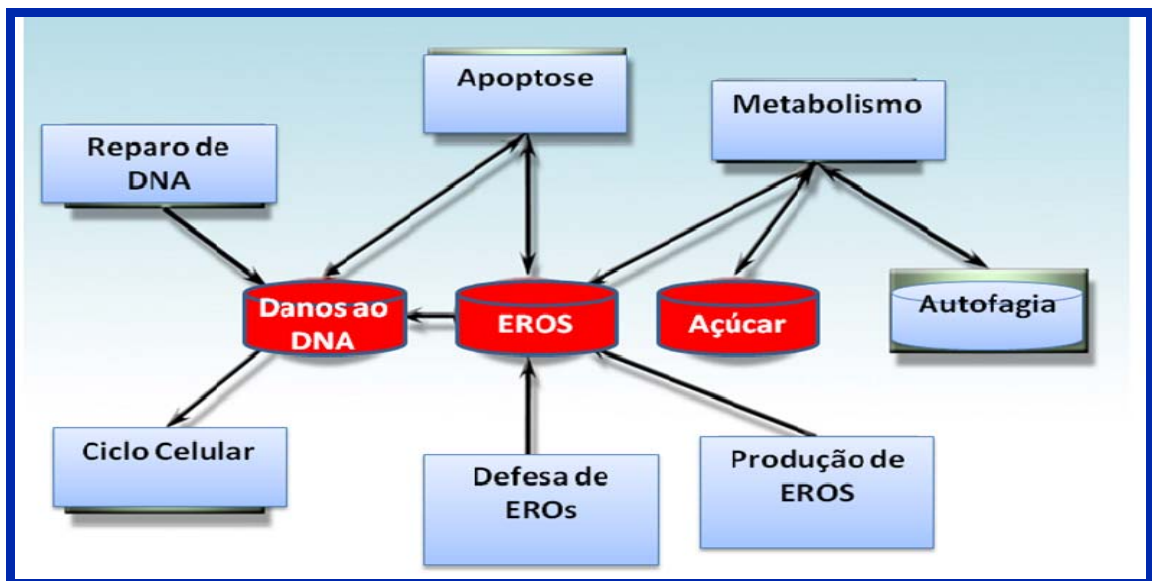


Figura 3. Mecanismo de ação de genes envolvidos em reparo de DNA, a exemplo do p53

Fonte: Adaptado de Mori, 2002.

Na ação antioxidante o desbalanço entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e os antioxidantes presentes no organismo pode resultar em condições patogênicas. O dano oxidativo pode iniciar o processo de carcinogênese ou de aterosclerose. Na mitocôndria, esse dano pode afetar o DNA, causar mutações e comprometer a respiração celular, induzindo à falência mitocondrial. Além disso, a superprodução de ERO (causada por disfunção mitocondrial) leva à abertura dos canais da membrana mitocondrial, que libera o citocromo C, o qual induz a morte celular apoptótica executada por enzimas (caspases), resultando em diferentes doenças, dependendo do tecido afetado. Os antioxidantes podem colaborar na prevenção desse processo, por meio da diminuição da injúria celular oxidativa, aumento ao estímulo a sistemas de defesa celular e proteção a oxidação do DNA ou inibição da apoptose de células de órgãos vitais. A alimentação pode

auxiliar na prevenção do dano, mas não quando este já está instalado (BERGER, 2004).

1.4.2.2 Teste de micronúcleos em células de mucosa bucal e com bloqueio de citocinese

O teste de MN é um teste citogenético que pode ser usado como biomarcador para avaliação de efeitos aneugênicos e clastogênicos em diversos organismos vivos. Este teste vem sendo usado desde 1980, para demonstrar danos citogenéticos induzidos por radiações, contaminantes ambientais, ocupacionais, estilo de vida, deficiências em nutrientes e outras doenças. É importante ressaltar que o teste de MN é um dos testes para avaliação de genotoxicidade menos invasivo e que causa poucos transtornos aos pacientes, quando comparados com os que necessitam de biopsia (STICH *et al.*, 1982; PASTOR *et al.*, 2003).

O teste de MN apresenta vantagens sobre a análise cromossômica clássica por ser um procedimento simples, eficaz e realizado a baixo custo. Além disso, a frequência de MN aparece elevada em tecidos expostos bem antes que qualquer sintoma clínico seja evidente, tornando-o valiosa ferramenta na prevenção da carcinogênese oral (GARAJ-VRHOVAC; KOPJAR, 1998).

O padrão de teste de mutagenicidade cromossômica segue a norma: “Guidelines for the testing of chemicals/section (OECD) 4: Health Effects – Mammalian Erythrocytes. Micronúcleos Test: nº 474 e a recomendação do Gene-Toxprogram, Environmental Protection Agency-EPAIUS”. Os MN são pequenos corpúsculos nucleares representando o material genético que foi perdido pelo núcleo principal, como consequência de um dano genético (**Figura 4**). Após a separação das cromátides no processo mitótico, dois núcleos são reconstituídos, um em cada pólo. A membrana nuclear é refeita ao redor destes dois conjuntos cromossômicos. Mas se um cromossomo inteiro ou um fragmento cromossômico acêntrico não se integra ao novo núcleo (por não estar unido ao fuso), este também pode constituir um pequeno núcleo individual (FENECH, 2000; HOLLAND *et al.*, 2008).

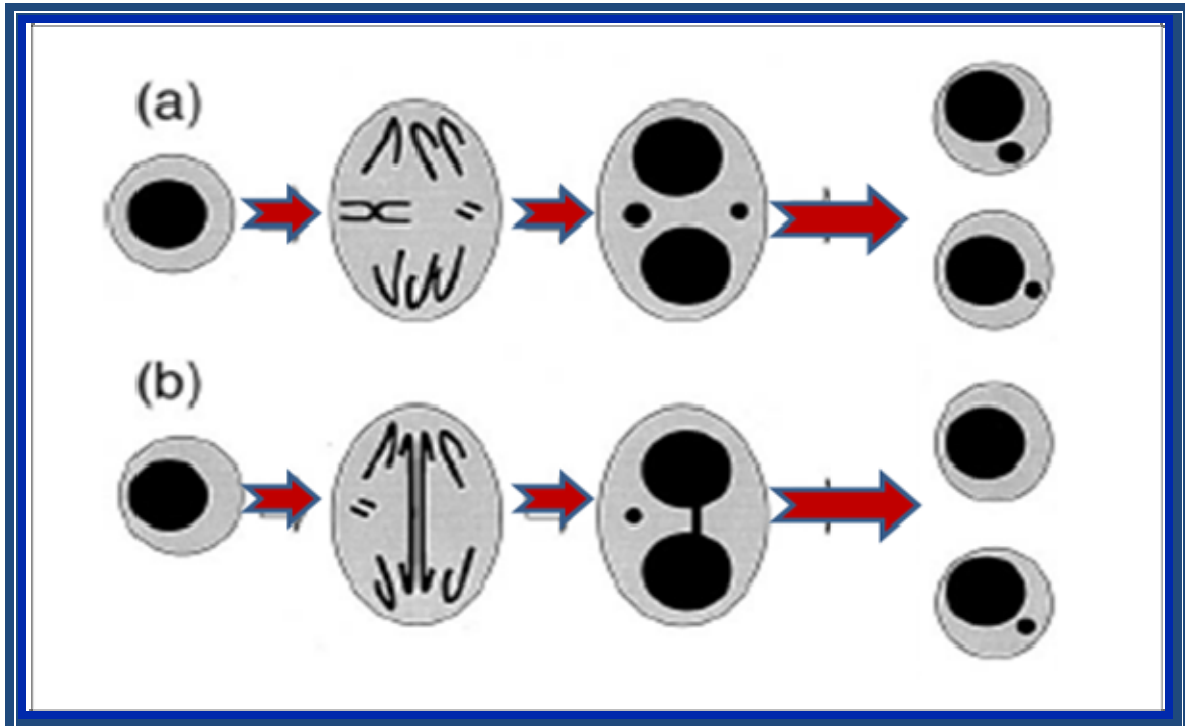


Figura 4. Formação de micronúcleo: (a) Origem de um MN a partir de um cromossoma inteiro e fragmentos cromossômicos acêntricos na anáfase; (b) formação de uma ponte a partir de cromossomas dicêntricos, onde os centrômeros se dirigem para os lados opostos da célula.

Fonte: Adaptada de Fenech, 2000.

A ocorrência dos MN representa uma resposta integrada de instabilidade de cromossomos, fenótipos e alterações celulares causadas por defeitos genéticos e ou exposição exógena a agentes genotóxicos, refletindo inúmeras alterações cromossômicas importantes para a carcinogênese (IARMARCOVAI *et al.*, 2008).

Os MN de células esfoliadas de mucosa bucal e de outras mucosas originadas de divisões no tecido epitelial são obtidas rapidamente, sem a necessidade de divisões *ex vivo*, como as células oriundas de culturas celulares, para análise de metáfases, como ocorre no teste de AC, que necessita do uso da colchicina para bloquear a proliferação de linfócitos. Cabe enfatizar que a redução na eficiência de reparo e acúmulo de mutações devido ao envelhecimento pode aumentar o nível de MN. Essas estruturas cromatínicas são coradas e são formadas pela exclusão de cromossomos ou de fragmentos de cromossomos durante a divisão celular (FENECH *et al.*, 1999b).

A formação de MN durante a divisão celular é resultado da quebra de cromossomos devido às lesões não reparadas ou reparadas de forma incorreta, ou ainda devido à má segregação dos cromossomos e má função mitótica. Esses eventos podem ser induzidos por estresse oxidativo, exposição aos agentes clastogênicos e aneugêncios. Essa heterogeneidade reflete a presença de múltiplas exposições externa e interna e ao grande número de alterações cromossômicas que eventualmente resulta na formação de MN. Dessa forma, os MN são usados como biomarcadores de instabilidade cromossômica, fixação de mutações e susceptibilidade genética e polimorfismos genéticos, fatores que podem explicar a sua associação com os riscos de câncer (FENECH, 2006).

O potencial de danos citogenéticos de agentes genotóxicos pode ser avaliado com o teste de MN como um biomarcador em linfócitos de sangue periférico e em células de mucosa bucal (FAN *et al.*, 2006). Células da mucosa bucal estão em constantes contatos com contaminantes ambientais. Desta forma, o epitélio bucal representa um tecido de importância para avaliação dos danos induzidos por substâncias inalantes. Os MN também podem ser avaliados em eritrócitos, linfócitos e epitélio esfoliado de mucosas nasal, urogenital, gástrica para avaliação de danos ao DNA dos organismos (CHEN *et al.*, 2006).

Os MN são reportados como de alto risco para o aparecimento do câncer, em resposta a agentes genotóxicos e carcinogênicos. Nas células esfoliadas de mucosas, eles refletem os eventos genotóxicos que ocorreram nas células em divisão da camada basal no período de uma a três semanas depois da ação dos agentes genotóxicos (STICH *et al.*, 1998). Eles podem ser detectados em células esfoliadas de mucosa bucal (**Figura 5**) e usados como indicativos de danos ao DNA (CERQUEIRA *et al.*, 2004).

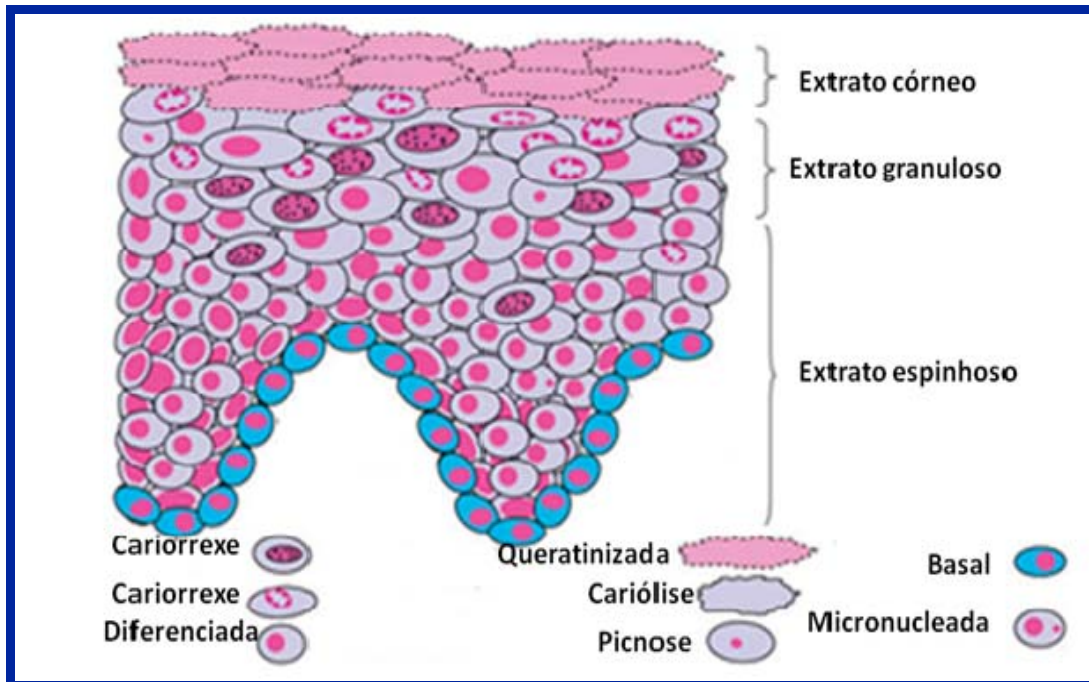


Figura 5. Secção da mucosa bucal indicando seus diferentes extratos, bem como o aparecimento de micronúcleos e de anormalidades nucleares.

Fonte: Adaptada de Thomas et al., 2007.

A análise de células epiteliais é importante, pois cerca de mais de 90 % dos cânceres tem origem epitelial (ROSIN *et al.*, 1990). Células esfoliadas de mucosa bucal têm sido mundialmente usadas na avaliação citológica para detectar morfológicas anormais, alterações de pre-malignidade e câncer. Assim tecido epitelial pode ser usado para o monitoramento de populações humanas expostas a vários agentes químicos e/ou físicos potencialmente genotóxico/mutagênicos e carcinogênicos (GUZMAN *et al.*, 2003).

As anormalidades nucleares podem ser consideradas, primeiramente, como uma resposta de citotoxicidade e, secundariamente, como eventos genotóxicos (TOLBERT *et al.*, 1992). Holland *et al.* (2008) descrevem a associação entre as anormalidades nucleares em células de mucosa bucal com a frequência de MN a exposição à genotoxinas. A citotoxicidade ainda não é bem conhecida como resposta às genotoxinas, isto porque a resposta aos danos genotóxicos é complexa podendo levar desde reparos, fixação de danos, mutações, eliminações de danos e morte celular (FRITZ; KAINA, 2006).

Várias estruturas conhecidas como “*rete pegs*” ou tipo de “*dedo*” projetam-se da camada basal durante o processo de renovação celular por divisão mitótica, onde as células migram para a superfície. A lâmina basal contém as células que expressam os danos genéticos, tais como os fragmentos, oriundos das quebras, bem como a perda de cromossomos inteiros durante a anáfase das células em divisão. As células filhas podem ou não ter MN e eventualmente, diferenciar-se em estrato espinhoso e em células esfoliadas da mucosa bucal. Algumas células podem degenerar-se com cromatina condensada, fragmentação nuclear (cariorrexes) ou perda do material nuclear (cariólises). A cariorrexe (CR) constitui-se na desintegração nuclear, com perda da integridade da membrana e representa uma manifestação precoce de apoptose. Raramente, as células podem tornar-se binucleadas e exibir brotos, como resultados de amplificação de genes (**Figura 6**). Esses biomarcadores, MN, brotos, CR, CL (apoptose) contribuem para o conhecimento de danos genômicos, no contexto da citotoxicidade (TOLBERT *et al.*, 1992).

As células com cromatina condensada são caracterizadas por possuírem núcleos com regiões agregadas, o que pode caracterizar um dos estágios da apoptose. Na CR as células são caracterizadas com uma aparência mais extensiva de agregação da cromatina, levando a fragmentação e a uma eventual desintegração do núcleo. Na CL o núcleo é completamente desintegrado, e representa a apoptose. As células binucleadas apresentam dois núcleos com morfologias semelhantes às das células com núcleos normais e a explicação para sua formação ainda não é bem entendida, mas existem indicativos de que podem ter origem de falhas na citocinese, durante a divisão nuclear (TOLBERT *et al.*, 1992).

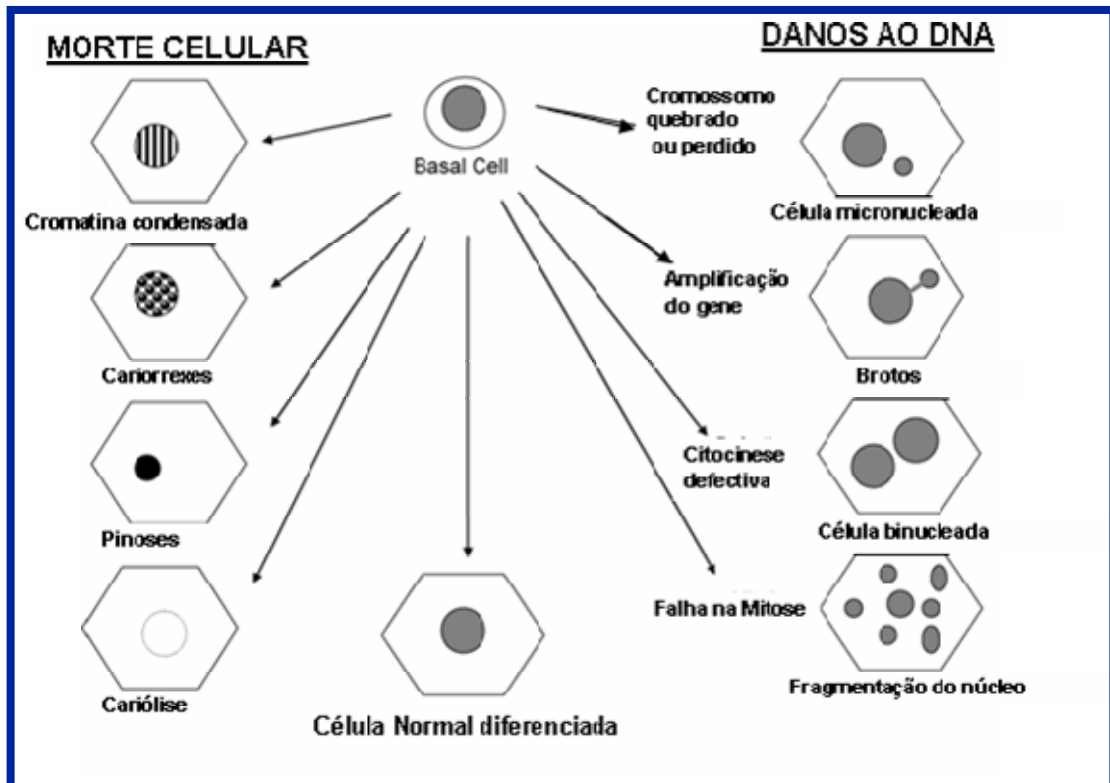


Figura 6. Modelo mostrando as diferentes células e os possíveis mecanismos de origem relativos à morte celular e aos danos ao DNA.

Fonte: Adaptado de Holland et al., 2008.

O teste de MN também pode ser feito com bloqueio de citocinese (**Figura 7**), como um sistema compreensivo para mensurar danos ao DNA e citocinese (HUAWEL *et al.*, 2009). O teste pode mensurar: (1) as pontes nucleoplasmáticas, que indica o rearranjo de cromossomos que ocorre quando os centrômeros de cromossomos dicêntricos ou cromátides são puxados para os pólos da célula durante a anáfase ou fusão de telômeros depois de quebras duplas de fita do DNA (UMEGAKI; FENECH, 2000); (2) brotos, que representam um mecanismo o qual a célula remove amplificação de DNA que é considerado como um marcador de amplificação de genes, originada de fragmentos acêntricos terminal ou intersticial (LINDBERG *et al.*, 2007).

A frequência de MN em sangue periférico tem sido mundialmente estudada como um biomarcador de danos cromossômicos para testes de genotoxicidade e estudos de biomonitoramento humano. Os MN em células mononucleadas indicam instabilidade no genoma e em células binucleadas evidenciam mutações em cromossomos/ genomas antes do preparo da cultura que

se expressam durante cultura *in vitro* (DECORDIER *et al.*, 2009) e representam quebras e perdas de cromossomos e pode ser usado para classificar químicos clastogênicos ou aneugênicos (MATEUCA *et al.*, 2006).

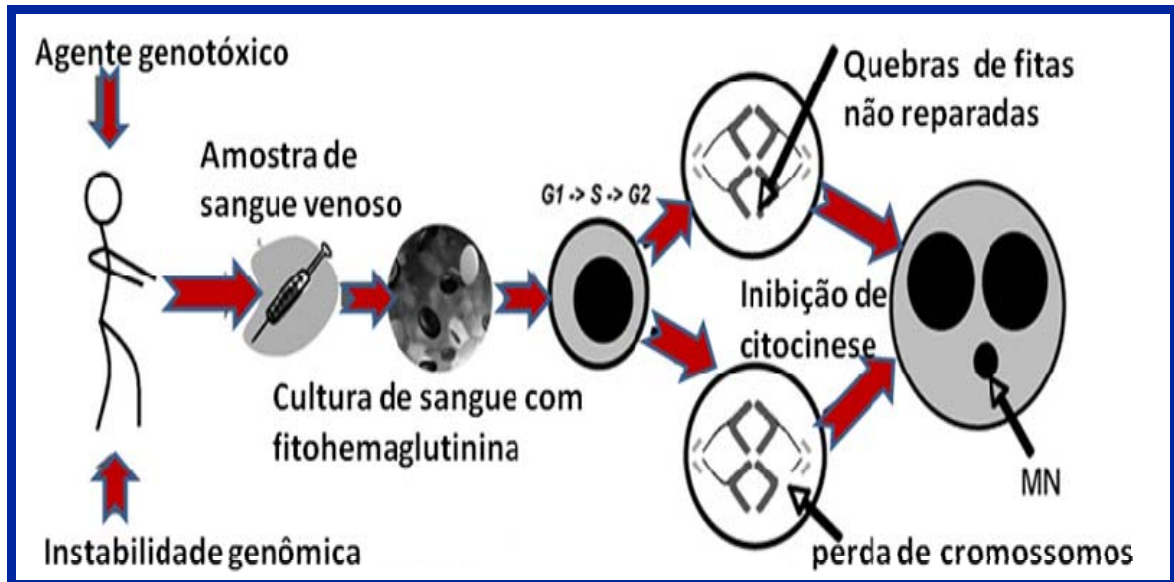


Figura 7. Mecanismos de formação de MN com bloqueio de citocinese.

Fonte: Adaptada de Iarmarcovai *et al.*, 2008.

A metodologia de MN com bloqueio de citocinese (CbMN) é desenvolvida com o uso da citocalasina B para identificar células que se dividem em cultura. A citocalasina B é um inibidor de polimerização de actina o qual é requerida para a formação do anel que divide o citoplasma durante a citocinese. Os danos induzidos por agentes químicos e ou físicos podem dependendo do agente induzir ou inibir necroses e ou apoptose. A indução de necrose pode resultar na liberação de enzimas degradativas que podem causar a digestão parcial de DNA. A inibição da apoptose pode ser descrita por significantes danos ao DNA que sobreviveram nas células mutantes micronucleadas (FENECH, 2000; FENECH *et al.*, 2006). A apoptose pode ser identificada como morte e ou suicídio celular caracterizada morfológicamente por processos ativos, gene regulados envolvendo condensação e fragmentação de DNA. A morte celular não é somente importante no desenvolvimento embrionário e no desenvolvimento de tecidos adultos, mas também em crescimento de tecidos de tumores (ARENDS *et al.*, 1990). A comparação entre apoptose e necrose é apresentada na **Tabela 5**, segundo Kirrsch-Volders e Fenech (2001).

Apoptose é uma forma de morte celular fisiológica onde ocorre remoção das células velhas, danificadas ou anormais, que poderiam interferir com as funções dos tecidos biológicos, com características distintas da morte celular patológica ou da necrose. As células apoptóticas sofrem fragmentação nuclear e brotamento citoplasmático para a formação de fragmentos celulares chamados de corpos apoptóticos, que são rapidamente fagocitados e destruídos pelos macrófagos vizinhos. A fragmentação celular não leva à liberação do conteúdo celular, e a fagocitose dos corpos apoptóticos não leva à inflamação, conseqüentemente sem danos às células adjacentes ou tecidos (TIZARD, 2000).

Tabela 5. Comparações morfológicas e bioquímicas entre apoptose e necrose.

Apoptose	Necrose
Alterações morfológicas	
Núcleo condensado; citoplasma contraído	Inchaço do citoplasma e mitocôndrias
Corpos apoptóticos com organelas	Lise das organelas e da célula
Não há liberação de enzimas lisossomais	Liberação de enzimas lisossomais
Alterações sem perda da integridade da membrana.	Perda de integridade da membrana; lise celular
Características bioquímicas	
Ativação de processos enzimáticos	Não há requerimento de energia
Ativação de caspases	Perda da regulação da homeostase iônica
DNA com fragmentação específica	Fragmentação inespecífica do DNA
Vias de indução e agentes causais	
Ocorre sob estímulos endógenos e exógenos específicos em condições fisiológicas normais.	Ocorre quando as células estão irreversivelmente danificadas
Agentes genotóxicos; drogas que afetam microtúbulos; falta de fatores de crescimento; citocinas.	Temperatura e pH extremos; hipoxia; trauma físico; agentes citotóxicos

Fonte: Adaptada de Kirsch-Volders e Fenech (2001).

A importância da apoptose no organismo é de remover células com problemas funcionais. A maquinaria regulatória da apoptose é altamente diferenciada por tecido, para responder a diversos agentes estressores. Entretanto, apoptose e necrose são dois caminhos diferentes de morte celular, sendo a apoptose regulada por genes FAS, CD 95, FADDs, envolvidos na ativação de caspases (Figura 8), processo esse que acontece por mecanismos extrínsecos e intrínsecos (ROOS; KAINA, 2006).

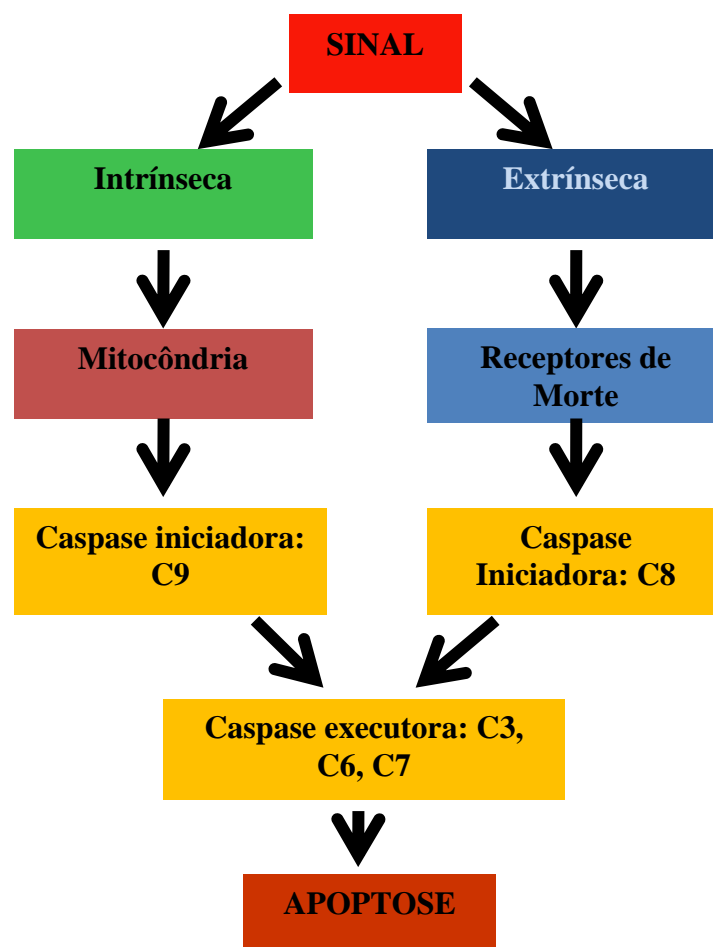


Figura 8. Vias da apoptose.
 Fonte: Adaptada de Roos e Kaina, 2006.

A necrose é o ponto final das alterações celulares, sendo uma consequência comum de inflamações, processos degenerativos e infiltrativos, e de muitas alterações circulatórias. O mesmo agente etiológico pode provocar tanto

necrose quanto apoptose, sendo que a severidade da agressão parece ser o fator determinante do tipo de morte celular (TIZARD, 2000).

Análises citogenéticas em linfócitos de sangue periférico tem sido uma técnica aceita para biomonitoramento de danos genéticos em células somáticas desde 1970, devido à exposição aos agentes clastogênicos. Danos ao DNA resultam de eventos hidrolíticos, radiações ou mutágenos químicos tem papel relevante em doenças degenerativas e envelhecimento. Biomonitoramento humano para potenciais mutágenos indicam claramente a possibilidade de doenças genéticas e câncer e contribui para identificar os fatores de riscos e mensurar marcadores genéticos (CARRANO; NATARAJAN, 1988).

Mudanças citogenéticas, expressão de genes e perfil epigenético podem ser usados para determinar status para químicos conhecidos como carcinógenos. O teste de AC em linfócitos periféricos e humanos é reconhecido e validado internacionalmente (ALBERTINI *et al.*, 2000), como um marcador validado para riscos de câncer em humanos, onde aumentos dos níveis de AC são efeitos biológicos claramente de populações expostas aos carcinógenos (BONASSI *et al.*, 2007).

1.4.2.3 Teste de aberrações cromossômicas

Métodos baseados na presença de AC são extensivamente usados para monitoramento biológico de populações expostas aos agentes mutagênicos e carcinogênicos (PASTOR *et al.*, 2003; HEUSER *et al.*, 2005). O teste de AC detecta mutações cromossômicas, ou seja, alterações que ocorrem no número ou estrutura de cromossomos, como quebras, formação de anéis, aumento do número de centrômeros, dentre outras (**Figura 9**). As AC são eventos importantes no desenvolvimento tumoral, pelo fato de que quebras em sítios específicos da molécula do DNA podem às vezes coincidir com a localização de oncogenes (SHAHAM *et al.*, 2001).

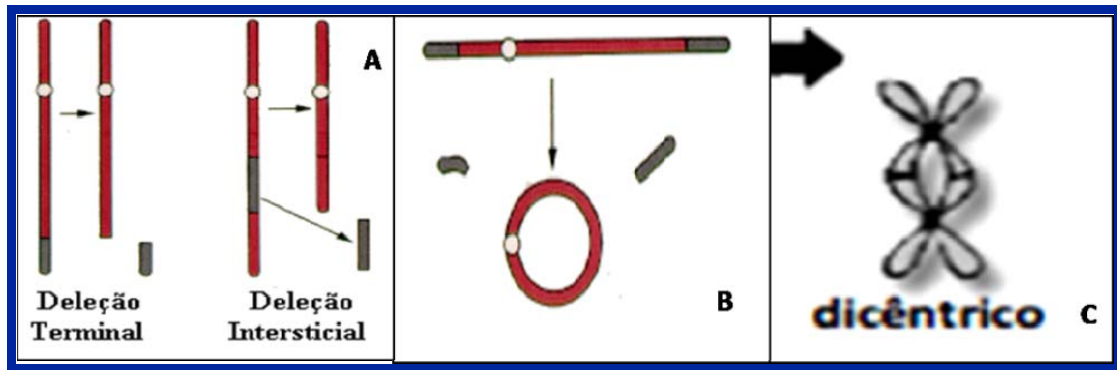


Figura 9. (A) Deleções Cromossômicas; (B) Formação do anel cromossômico; (C) Cromossomo dicêntrico.

Fonte: Adaptado por Thompson e Thompson, 1991.

As alterações cromossômicas estruturais são assim denominadas porque afetam a estrutura dos cromossomos, sendo resultantes de quebras que ocorrem, em geral, antes da duplicação do DNA. Tais quebras são ditas espontâneas quando não têm uma causa aparente, mas é sabido que sua frequência aumenta sob a ação de agentes diversos que são denominados agentes clastogênicos. As quebras originam segmentos sem telômeros, os quais são estruturas essenciais para manter a individualidade dos cromossomos. As extremidades livres ficam literalmente pegajosas, favorecendo a reunião com outro segmento nas mesmas condições, isto é, que tenha perdido também a região telomérica. Os segmentos quebrados podem se soldar, quando entra em ação a síntese de reparo de DNA da célula, na qual intervêm outras polimerases, diferentes daquelas que atuam na duplicação semiconservativa que antecede as divisões celulares. As quebras não produzem necessariamente modificação na estrutura do cromossomo, pois os segmentos podem se reunir no mesmo ponto onde foram quebrados. Contudo, cromossomos com estrutura alterada podem ser formados, quando os segmentos se unem de forma distinta da original ou quando fragmentos são simplesmente perdidos. As quebras não ocorrem aleatoriamente em qualquer região do cromossomo, existindo os chamados sítios frágeis mais propensos a se quebrarem (KASAHARA, 2009)

O teste de AC em linfócitos do sangue periférico é uma avaliação sensível para detectar danos causados pela exposição a agentes mutagênicos, podendo elevar o risco de desenvolvimento do câncer (BONASSI *et al.*, 1995). A relação de aparecimento de AC com o câncer baseia-se no conceito de que danos genéticos em linfócitos refletem danos semelhantes em células cancerosas. A análise de AC é

considerada útil para estimar o comportamento biológico de cada caso de câncer , uma vez que o estudo do cariótipo representa o passo inicial na determinação de mudanças cromossômicas nas células (HOFFMANN; SPEIT, 2005).

A frequência de AC é um excelente biomarcador de danos induzidos por carcinógenos genotóxicos (DEARFIELD, 2002). Os níveis de AC em linfócitos periféricos podem ser considerados como relevante biomarcador para identificar pessoas que correm riscos de câncer (IARC, 2000), mostrando associação com riscos de câncer (HAGMAR et. al., 2004). A alta frequência de AC pode predizer o aumento de risco de câncer (ROSSNER *et al.*, 2005).

As aberrações cromossômicas são quaisquer mudanças na estrutura do cariótipo, que criam um novo contexto genético pela movimentação do DNA de um lugar para outro, diferente do original. A análise de AC é um teste de mutagenicidade para a detecção de AC estruturais. Aberrações estruturais podem ser de 2 tipos: cromossômicas (quando ocorre simultaneamente nas duas cromátides de um cromossomo) e cromatídicas (em uma só cromátide). A maioria dos mutagênicos químicos induz aberrações do tipo cromatídico, mas as do tipo cromossômico também ocorrem. Determinar a frequência de AC em linfócitos do sangue periférico humano, com o propósito de dosímetro biológico de exposição a agentes mutagênicos químicos, constitui uma técnica importante para estimar o risco em exposições ocupacionais. Detectar apenas AC indica que existe um dano genético grosseiro; a ausência destas não exclui outras possíveis alterações no DNA. Porém, a presença de AC indica uma possível ligação com a exposição a genotóxicos (RIBEIRO e MARQUES, 2003).

1.4.3 Fatores de interferências não ocupacionais

A resposta individual ao estresse pode variar de acordo com várias condições, tais como a função particular e a combinação de genes, a absorção e metabolismo, morte celular (apoptose/necrose, controle do ciclo celular, reparo de DNA e resposta imune e deficiências em micronutrientes (GOODE *et al.*, 2002; THIER *et al.*, 2003). Existem relatos de associações entre polimorfismos genéticos e formação de MN e que variantes genéticas podem modular os efeitos da exposição

ambiental aos agentes genotóxicos, bem como: idade, características de estilo de vida (álcool, fumo, folatos) e doenças cardiovasculares e câncer (IARMARCOVAI *et al.*, 2008). O modelo da exposição ambiental a agentes genotóxicos associados aos fatores de estilo de vida e o *background* dos efeitos biológicos e clínicos esta apresentado na **Figura 10**.

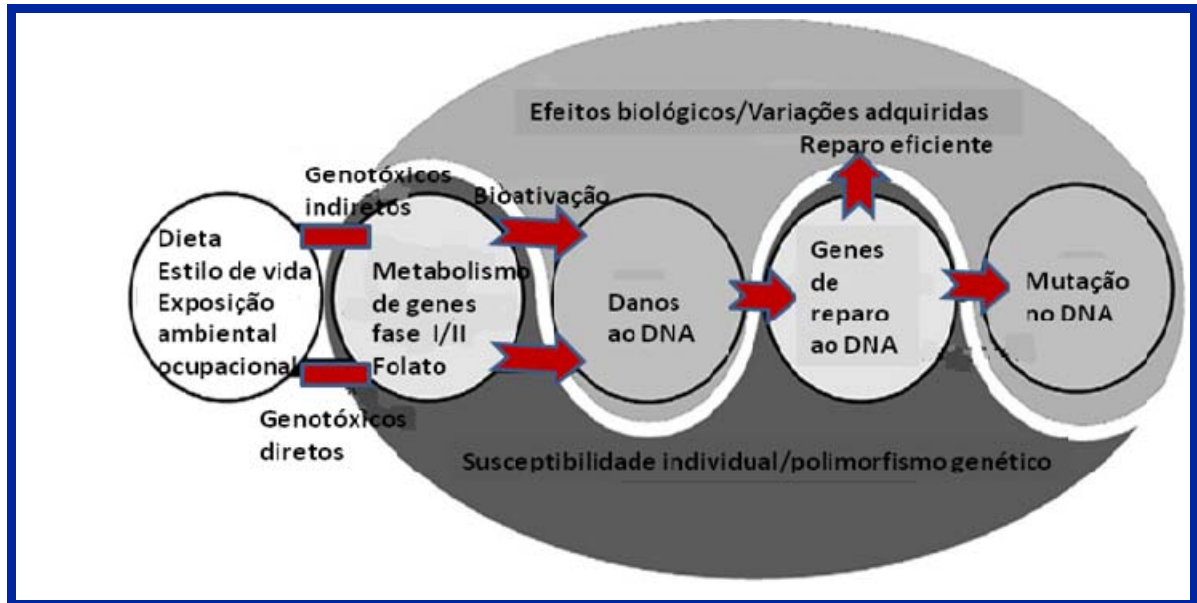


Figura 10. Relações entre os fatores de riscos genéticos, estilo de vida e mutações ao DNA, com exposição ambiental e ocupacional a agente genotóxicos.

Fonte: Adaptada de Thier et al., 2003.

Os estudos com células de mucosa bucal para a avaliação de danos genotóxicos datam de 1980, inicialmente, para identificar os efeitos do tabaco. Inúmeros estudos vêm sendo realizados com células da cavidade oral de fumantes e os resultados mostram aumento da frequência de MN, bem com o aumento de células em apoptose (STICH *et al.*, 1982; STICH *et al.*, 1998). Muitos estudos com o uso de células de mucosa bucal têm sido publicados com resultados de investigações sobre diversos fatores de riscos relacionados com a exposição ambiental, ocupacional, exposição às radiações, quimioterapia, radioterapia, suplementação vitamínica, hábitos e estilos de vida, câncer e outras doenças (HOLLAND *et al.*, 2008).

Na interpretação de genotoxicidade com os testes de MN e de AC em sangue periférico em estudos de biomonitoramento, inúmeros fatores de riscos

devem ser avaliados, tais como idade, gênero, fumantes, status de vitamina B12 e folatos que foram evidenciados como impactadores nas respostas dos estudos de biomonitoramento com os testes de genotoxicidade. Assim a avaliação desses fatores deve ser incluída rotineiramente. Apesar de evidências insuficientes outros fatores tais como o consumo de álcool, doenças, infecções, exercícios físicos, biomassa corporal e genótipos também podem influenciar nas interpretações de dados de genotoxicidade. Essas análises são necessárias para as considerações sobre a indução de MN e AC em sangue periférico, em estudos de correlações entre a exposição química ambiental e ocupacional (BATTERSHILL *et al.*, 2008).

1.4.3.1 Idade e gênero

Aumento na frequência de MN com idade e gênero foi observada por Kirsch-Voldere *et al.* 2006. Imperfeições no sistema celular de defesa que protege contra a fixação de danos ao DNA tais como os danos induzidos ao DNA pelas espécies reativas de oxigênio (ERO) decrescem a eficácia do reparo de DNA e pode levar ao acúmulo de mutações que em combinação com a idade pode contribuir para o envelhecimento e o desenvolvimento de patologias relacionadas com idade (GORBUNOVA; SELUANOVA, 2005). Existem evidências de interações entre gênero e genótipo em relação às defesas antioxidantes da enzima glutathione peroxidase (BASTAKI *et al.*, 2006).

Existem grandes correlações entre o aumento da idade e a frequência de MN, entretanto, em relação às AC existem baixas correlações (BOLOGNESI *et al.*, 1999). Depois de 30 anos os efeitos da idade é mais pronunciado em fêmeas (BUKVIC *et al.*, 2001), sugerida pela perda de cromossomos. Entretanto, outros estudos não demonstram correlações de MN em linfócitos humanos com idade (RADACK, *et al.*, 1995). Aumento na frequência de MN com idade e gênero foi observada por Kirsch-Voldere *et al.* (2006). Diferenças em relação ao gênero foram observadas para a incidência de MN em linfócitos de sangue periférico, com alta frequência em mulheres.

De forma similar Fenech (1998) relata um aumento na frequência de MN de 1.2 para 1.6 em fêmeas em relação aos machos. Muitos estudos mostram altas e

significantes correlações entre MN e AC para homens, entretanto, para AC os dados ainda não são conclusivos. Assim, é pragmático incluir também em investigações de genotoxicidade com o uso de MN e AC, sujeitos de ambos os sexos (BROGGER *et al.*, 1984).

1.4.3.2 Tabagismo

O fumo é uma importante variável para induzir significantes alterações no material genético, indicado por biomarcadores citogenéticos tais como as AC e quebras de cromátides irmãs (ÇELIK; AKBAS, 2005) e aumenta os riscos de câncer. Isto tem sido bem sugerido pelo aumento de MN em células epiteliais de mucosa bucal (ÇELIK *et al.*, 2003). A exposição ao fumo também tem efeitos nas frequências de MN, CR, CL, células binucleadas (ERGENE *et al.*, 2007).

Em relatos de danos ao DNA em linfócitos de sangue periférico com o teste de MN e cometa existem diferenças significantes entre fumantes e não fumantes (HOFFMANN e SPEIT, 2005). Associação entre o fumo e o câncer, devido à diversidade de substâncias químicas que compõe o tabaco serem consideradas como genotóxicos e carcinógenos (IARC, 2002). Estudos indicam o aumento da frequência de MN em linfócitos de sangue periférico em fumantes (FENECH, 1993; SCHNEIDER *et al.*, 2001).

Em avaliação genotóxica com o teste cometa diferenças significativas foram observadas entre população fumantes, não fumantes e fumantes passivos, pelo aumento da cauda, oriunda da grande migração de DNA nos fumantes, de forma associada com os níveis de glutathione peroxidase e tocoferol, indicando a indução de danos oxidativos (ZALATA *et al.*, 2007). Entretanto, inúmeros relatos indicam que não existem associações entre fumantes e o aumento da migração de DNA em linfócitos periféricos de fumantes de mais de 20 cigarros por dia (SPEIT *et al.*, 2003; HOFMANN; SPEIT, 2005). Diante de muitas controvérsias sobre as influências do uso do fumo em estudos de biomonitoramento ocupacional, outras análises podem ser feitas para melhor esclarecer os diferentes relatos, a exemplo do estudo de polimorfismo genético de populações expostas (BATTERSHILL *et al.*, 2008).

Estudos relacionam o polimorfismo genético e a formação de MN, como resposta ao tabaco. O tabaco contém uma mistura de substâncias com efeitos genotóxicos e carcinógenos que metabolicamente ativam as enzimas de fase I, especialmente as CYP1A1 ou as detoxificação (enzimas de fase II, GST), além de polimorfismos de proteínas envolvidas no reparo de danos ao DNA induzidos pelo tabaco (NORPPA, 2004). Associações também foram evidenciadas entre polimorfismos da CYP1A1 ou GSTM1 em homens com câncer de pulmão (HUSGAFVEL-PURSIAINEN, 2004). Outro aspecto de importância é que a exposição ocupacional pode ser correlacionada com o significativo aumento da frequência de MN em sangue periférico de trabalhadores que fumam (BONASSI *et al.*, 2003).

1.4.3.3 Etilismo

As bebidas alcoólicas têm sido comumente associadas ao câncer (Committee on *Carcinogenicity*, 1995), entretanto os mecanismos de ação ainda não foram bem elucidados e ainda não existem relatos de mutagenicidade em roedores, e os dados sobre os efeitos de bebidas alcoólicas na indução de MN e AC em linfócitos de sangue periférico ainda não são conclusivos. Entretanto, estudos de polimorfismos da enzima ALDH 2 (aldeído desidrogenase), que age no metabolismo do acetaldeído (Committee on *Mutagenicity*, 2000), e que algumas doenças originadas do consumo de bebidas alcoólicas podem influenciar na indução de MN e de AC. Variantes do gens ALDH2 são significativamente associados com genotoxicidade induzida pelo álcool na formação de MN. A eficiência de converter etanol para acetaldeído e subseqüentemente para acetato é determinada pelo gene ADH e ALDH, com diferenças individuais, especialmente para a ADLH2.2, que codifica uma subunidade da ADLH2 que prevalece em populações (MAFFEI *et al.*, 2002).

1.4.3.4 Micronutrientes

A função dos micronutrientes na manutenção da estabilidade genômica tem sido extensivamente revisada na literatura (FENECH *et al.*, 1999b). Existem relatos de que dieta pobre em micronutrientes aumenta o risco de doenças

degenerativas, incluindo o câncer (AMES, 2001; FENECH *et al.*, 1999b). Sabe-se que as vitaminas e os minerais são essenciais para a manutenção da estabilidade do genoma, bem como podem influenciar em muitos aspectos do metabolismo do DNA, incluindo síntese, reparo, metilação e apoptose (PASTINK *et al.*, 2001).

As evidências de que os micronutrientes são importantes para a estabilidade genômica foram relatadas em estudos de intervenção, com suplementação de vitaminas A, C e E, devido aos seus efeitos protetores em quebras de cromossomos, hipometilação de DNA e proteção aos danos oxidativos (FENECH *et al.*, 2005; ABRAMSSON-ZETTERBERG, 2006).

Dentre os fatores que podem prever a formação de MN, os micronutrientes por sua capacidade de proteção ao DNA encontram-se, quando em deficiências nutricionais como indutor da formação de MN (BEETSTRA *et al.*, 2006). As quebras e perdas dos cromossomos envolvem diferentes disfunções celulares como fragmentos de cromossomos acêntricos resultam em quebras duplas pode levar a formação de micronúcleos, que pode ser afetada por co-fatores como magnésio e cálcio (MATEUCA *et al.*, 2006).

As doenças cardiovasculares e câncer são as maiores causas de mortalidade no mundo. Ambas constituem fatores de riscos, incluindo o fumo e dieta, como também processos patogênicos, tais como inflamações crônicas e estresse oxidativo que ocasionam instabilidade genética. Deficiências nutricionais e variantes do gene MTHFR e outros polimorfismos relacionados ao metabolismo de folato podem ser determinantes nas doenças coronárias (BOTTO *et al.*, 2003). Além desses aspectos a interação gene-dieta modulada por polimorfismos no metabolismo e nas respostas de reparo do DNA, em resposta a deficiências de micronutrientes podem ser igualmente importante na determinação da estabilidade genômica e dos riscos das doenças (FENECH *et al.*, 2005).

1.4.3.5 Polimorfismos de genes

Na avaliação por AC de indivíduos expostos a xenobióticos correlações foram evidenciadas a genes de polimorfismo genético, envolvidos em

biotransformações e reparo, foi observado que a frequência de AC de grupos expostos é elevada em relação do grupo não exposto, para os fumantes (MUSAKA *et al.*, 2008). Polimorfismos genéticos de enzimas que controlam a aneugênese (inibidores de tubulina e topoisomerasas e ciclinas) ou interferências em genes envolvidos no controle do ciclo celular foram evidenciados em respostas aos xenobióticos (hCDC4) (MATEUCA *et al.*, 2006).

Os efeitos do polimorfismo genético na formação de MN são complexos, influenciados por polimorfismos de várias enzimas envolvidas no metabolismo de xenobióticos, proteínas de reparo de DNA e enzimas envolvidas no metabolismo de folatos. Assim variantes genéticas influenciam na interação com os fatores ambientais e podem ter conseqüências na frequência de MN em humanos (IARMARCOVAI *et al.*, 2008). Aumento na sensibilidade a mutágenos (peróxido de hidrogênio, agrotóxicos, antineoplásicos) foi detectada em pacientes com mutações no BCRCA1/2, sugerindo que a indução de MN nos diferentes mecanismos de reparo de DNA pode ser afetada por mutações no BRCA1/2 em concordância com o papel central desses genes na manutenção da integridade do genoma (SPEIT; TRENZ, 2003).

Existem relatos de que diferenças na capacidade metabólica podem ser modificadas em respostas individuais aos compostos genotóxicos e são indicativas de susceptibilidade ao câncer, devido ao polimorfismos genético em enzimas de fase I (ativação) e de fase II (inativação). A enzima de fase I citocromo P450 2E1 (CYP2E1) é envolvida no metabolismo indireto de carcinógenos. Os fatores ambientais, incluindo os agrotóxicos, podem alterar a atividade de CYP2E1 28. As enzimas de fase II glutationa S-trasferase são as mais importantes na detoxificação de várias espécies reativas de oxigênio, incluindo as geradas pelos agrotóxicos, mas as mesmas apresentam polimorfismos genéticos em humanos e assim genótipos nulos para os genes GSTT1 e GSTM1, como também para GSTP1 tem sido associado como de riscos para câncer (BOLOGNESI, 2003).

JUSTIFICATIVA

2 JUSTIFICATIVA

No Piauí, a expansão agrícola em implemento nos cerrados, por intermédio da intensificação do plantio de soja a partir da década de 1990, consistiu em um forte fator para o aumento do uso de agrotóxico. A procura legal destes produtos no Estado cresce progressivamente, uma vez que em 1994 foram contabilizados a venda de apenas 8 toneladas e em 2004 se eleva para 165 toneladas, representando um percentual de aumento da ordem de 2.062% (PIAÚÍ, 2004).

Partindo deste princípio e norteado pelos resultados de pesquisa anterior realizada na região dos cerrados, evidenciando que o uso de agrotóxicos apresentou risco aos trabalhadores agrícolas onde, entre uma das recomendações do estudo, foi o mapeamento do uso de agrotóxicos, para avaliação de efeitos à saúde humana de químicos potencialmente mutagênicos e carcinogênicos, especialmente os relacionados à exposição dos trabalhadores rurais aos agrotóxicos em todo o Estado do Piauí (CHAVES, 2007), realizou-se este estudo.

Para a escolha dos municípios (Barras, José de Freitas, Picos e Piripiri), além do mapeamento, levou-se em consideração o registro do número de casos de mortes e adoecimento de trabalhadores rurais supostamente intoxicados, notificados pelo SINAN (Sistema de Notificação de Agravos Notificáveis), e os registros de casos de intoxicações por agrotóxicos registrados no CITOX (Centro de Informação Toxicológica), mesmo entendendo que esses dados retratam muito pouco a realidade devido à sub-notificação.

Espera-se com os resultados, contribuir para estabelecer um prognóstico em relação ao desenvolvimento do câncer, a fim de fornecer aos serviços de vigilância em saúde, subsídios para a implantação de medidas de proteção a estes trabalhadores.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar os efeitos tóxicos e genotóxicos/mutagênicos da exposição ocupacional às misturas complexas de agrotóxicos em trabalhadores rurais do Estado do Piauí.

3.2 Específicos

Identificar a toxicidade da exposição aos agrotóxicos em agricultores do Piauí, com uso de parâmetros bioquímicos e hematológicos.

Determinar a incidência de danos ao DNA dos linfócitos sanguíneos periféricos e em células esfoliadas de mucosa bucal dos agricultores expostos aos agrotóxicos, pelo Ensaio Cometa.

Avaliar a frequência de micronúcleos em agricultores expostos à mistura complexa de agrotóxicos, com a aplicação do teste de micronúcleos em culturas de linfócitos e em células esfoliadas de mucosa bucal.

Analisar as frequências de alterações estruturais em cromossomos isolados de linfócitos de sangue periférico dos agricultores expostos cronicamente aos agrotóxicos, através do teste de aberrações cromossômicas.

Avaliar a frequência de anormalidades nucleares indicativas de citotoxicidade, apoptose e necrose em células esfoliadas de mucosa bucal pelo teste de micronúcleo e em cultura de linfócitos de agricultores expostos aos agrotóxicos pelo teste de micronúcleo com bloqueio de citocinese.

Correlacionar os dados sócio-econômicos e de saúde da população de agricultores expostos aos efeitos tóxico/genotóxicos induzidos pelos agrotóxicos.

4 METODOLOGIA

4.1 Tipo de Estudo

O estudo foi baseado num modelo transversal de investigação, delineado de forma a permitir que se obtenha uma avaliação clínica, epidemiológica e laboratorial objetivando investigar os possíveis casos de contaminação humana por agrotóxicos nos municípios do Estado do Piauí.

4.2 Caracterização dos Grupos de Estudos

A população estudada constituiu uma amostra de 152 voluntários do sexo masculino, com idade entre 18 e 69 anos, sem restrição quanto ao grupo étnico. 97 agricultores foram selecionados entre os trabalhadores rurais, que estão potencialmente expostos aos agrotóxicos (grupo exposto) nos seus respectivos locais de trabalho, nos municípios de Picos, Piripiri, Barras e José de Freitas (**Figura 11**). Estes municípios fazem parte de uma proposta ampla de mapeamento do uso de agrotóxicos, para avaliação de efeitos à saúde humana de químicos potencialmente mutagênicos e carcinogênicos, especialmente os relacionados à exposição dos trabalhadores rurais aos agrotóxicos em todo o Estado do Piauí. Para o grupo controle foram selecionados 55 indivíduos do sexo masculino com idade acima de 18 anos, não expostos aos agrotóxicos, com funções administrativas, na capital Teresina (grupo não exposto).



Figura 11. Municípios selecionados para o biomonitoramento dos riscos dos agrotóxicos em agricultores.

Fonte: <http://www.guianet.com.br/pi/mapapi.gif> Acesso em 29/07/2010.

4.3 Caracterização dos Municípios

O município de Picos possui 71.825 habitantes, com uma densidade de 89,4 habitantes por Km². Está localizado na região centro-sul do Piauí em um ponto estratégico situado entre picos montanhosos, e no cruzamento de várias rodovias. Cortado pelo trecho inicial da Transamazônica, Picos é o principal entroncamento rodoviário do Nordeste que liga o Piauí ao Maranhão, Ceará, Pernambuco e Bahia. A cidade de Picos apresenta o terceiro maior Produto Interno Bruto (PIB) do Estado. A cidade de Picos está a uma distância de 438 km da capital Teresina (IBGE, 2007).

O município de Piriipiri está localizado a 180 quilômetros de distância da capital. Integra a mesorregião do norte Piauiense, microrregião do Baixo Parnaíba. Encontra-se a 04° 16' 24" de latitude sul e, a uma longitude 41° 46' 37" oeste, estando a uma altitude de 170 metros. Possui uma área de 1.308,8 km² e uma população de 62.921 habitantes. O município produz frutas (banana, manga, laranja, tomate e melancia), leguminosas, arroz e cana-de-açúcar. Esta última pode alcançar produtividade de 50 mil Kg/hectare. O PIB do município chega a mais de 194 mil (IBGE, 2007).

O município de Barras localiza-se na microrregião do Baixo Parnaíba Piauiense, mesorregião do Norte Piauiense. O município tem 43.328 habitantes e 1.776 Km². Está situado a 126 quilômetros de distância da capital Teresina. No município é produzidas diversas culturas de frutas e cultivadas algumas lavouras de leguminosas como feijão cuja colheita anual pode chegar a 374 toneladas segundo dados de 2007 do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE).

O município de José de Freitas localiza-se na Macrorregião Meio Norte, Território de desenvolvimento Entre Rios, limita-se ao norte com Lagoa Alegre/Cabeceiras do Piauí/Campo Maior; ao Sul com Altos/Teresina; a Leste, com Campo Maior e Oeste com União/Lagoa Alegre/Teresina. Sua população é de 36.483 habitantes, com uma extensão territorial de 1.538 km². Segundo dados do IBGE, trabalham na agropecuária 4.672 trabalhadores. Do total de residências, 44, % possuem abastecimento d'água, 58,8% não tem instalação sanitária e apenas 15,7% possui coleta de lixo domiciliar. Em relação a cobertura dos serviços de saúde

pública, existem 21 ambulatórios e 86,1% da população tem cobertura da Estratégia Saúde da Família. Na agricultura, dos 9.079 hectares de área cultivada, 39,2% é de cana de açúcar e 34,1% de arroz de sequeiro, seguido da cultura do milho, mandioca e feijão macaçar, com 16,01 %, 9,2 % e 1,39 % hectares respectivamente (CONAB, 2010). Dos 2.451 estabelecimentos agropecuários, 7,26 % utilizaram agrotóxicos. (IBGE, 2006-censo agropecuário).

4.4 Aspectos Éticos

A pesquisa, com o protocolo experimental e o termo de consentimento, foi submetida ao Comitê de Ética em Pesquisa da UFC, credenciado pelo CONEP – Conselho Nacional de Saúde/MS. Os ensaios somente foram iniciados após a aprovação expedida pelo Comitê de Ética. O comitê no ato de suas atribuições expediu o documento de aprovação com número de protocolo 174, em 26 de setembro de 2008 (ANEXO A). Uma cópia da aprovação foi enviada a Secretária de Estado da Saúde do Piauí, antes do início do estudo. O Estudo foi conduzido com devido respeito aos critérios estabelecidos pela declaração de Helsinque (1964) e suas revisões assim como a Resolução 196/96 do CNS-MS. Os voluntários receberam explanação da natureza e dos objetivos do estudo. Foi enfatizado que o estudo tem a finalidade de pesquisa aplicada. Os voluntários foram cientes de que é livre para se retirar a qualquer momento do estudo, sem ser obrigado a fornecer o motivo de fazê-lo, e sem que isto cause qualquer prejuízo aos mesmos. Todos os resultados obtidos no processamento das amostras foram entregues aos respectivos voluntários da pesquisa, e também entregues a equipe de saúde da família dos respectivos municípios, para adoção de medidas de preventivas e assistenciais, em ação conjunta com a Diretoria de Vigilância Sanitária, por intermédio do Centro Estadual de Referência em Saúde do Trabalhador, respeitando os mesmos e preservando o sigilo das informações.

4.5 Seleção da Amostra

Inicialmente, a mobilização dos trabalhadores foi feita em parceria com profissionais de saúde, sindicatos e lideranças comunitárias. Em seguida, foi realizada uma palestra de sensibilização, visando esclarecer os riscos que atingem

os trabalhadores em decorrência do uso de agrotóxicos, e a conseqüente motivação para engajamento de todos na pesquisa. Os trabalhadores que concordaram em participar da pesquisa tiveram que, no ato, assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), garantindo assim a sua adesão a pesquisa (ANEXO A).

Para fins de avaliação do trabalhador rural exposto aos agrotóxicos, foi aplicado um questionário para entrevista (ANEXO B) abrangendo questões demográficas, hábitos de vida (alimentares, tabaco, álcool, café), bem como ocupacionais, históricos médicos e familiares, duração da aplicação, tipos dos agrotóxicos e os equipamentos de proteção individual (EPIs), utilizados para o grupo exposto. O questionário aplicado é recomendado pela *International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and a Carcinogens* (ICPEMC) (CARRANO; NATARAJAN, 1988). Após preenchimento do questionário, realizou-se a coleta de amostras biológicas dos trabalhadores para a análises laboratoriais.

Foram utilizados como critérios de inclusão: trabalhadores do sexo masculino, que estão no mínimo há um ano, expostos a agrotóxicos, com idade acima de 18 anos e capazes de compreender a natureza e objetivo da pesquisa, confirmado pela assinatura do TCLE. Foram excluídos da pesquisa os sujeitos que, apresentavam alguma infecção e lesões bucais; que tenham se submetidos a raios X, tomografia ou qualquer outro procedimento radiológico há menos de três meses; feito tratamento quimioterápico ou radioterápico, em algum momento da vida.

4.6 Coleta e Transporte das Amostras

A coleta das amostras biológicas foi feita por profissionais capacitados do Laboratório Central de Saúde Pública do Estado do Piauí (LACEN), nas respectivas localidades de trabalho dos voluntários, em cada um dos municípios incluídos na pesquisa. No ato, foram utilizados tubos vacutainer heparinizados e com EDTA, também foram utilizados tubos de hemólise sem anticoagulante para as dosagens bioquímicas. Os tubos foram identificados com os códigos criados para cada sujeito e acondicionados em uma caixa térmica com amplo espaço e, sob temperatura de 2° a 4° C, sendo cada tubo disposto de maneira a não comprometer a confiabilidade dos parâmetros dos estudos conduzidos posteriormente.

A quantidade de sangue coletada de cada trabalhador foi 15 mL. As células esfoliadas de mucosa bucal foram coletadas com o uso de escova cervical na parede da mucosa bucal, sem raspagem da língua e submersas em uma solução salina isotônica (0,9%) contida em tubos falcon rotulados, com os códigos dos sujeitos, e protegida da ação da luz até a chegada ao laboratório, para iniciar o processamento. O tempo de transporte que as amostras levaram para chegar ao laboratório variou entre duas a seis horas, dependendo da distância do município até ao laboratório no município de Teresina. O período de coleta de todas as amostras foi de novembro de 2008 a dezembro de 2010.

4.7 Avaliação Hematológica

A avaliação dos resultados das análises hematológicas e bioquímicas foram comparadas com os valores de referência do LACEN-PI, constantes nos ANEXOS C e D. Para o estudo hematológico, amostras de sangue foram colocadas em tubos de hemólise contendo anticoagulante, ácido etileno diaminotetracético (EDTA). Logo após a coleta eram feitos os esfregaços das lâminas com coloração pelo Panótico. Amostras da coleta de sangue foram analisadas para testes hematológicos utilizando o analisador automático Sysmex-KX21. Diferentes parâmetros hematológicos foram utilizados: hemoglobina (Hb), hematócrito (Ht), número de eritrócitos (RBCs) no sangue total, leucograma com contagem de leucócitos e a contagem de plaquetas (OLIVEIRA, 2007).

4.8 Avaliação Bioquímica

As amostras de sangue foram colhidas em tubos de hemólise sem anticoagulante. Após a coagulação do sangue, este foi submetido à centrifugação para retirada do soro utilizado nas análises bioquímicas realizadas. Tais amostras foram utilizadas para as dosagens séricas de uréia (método enzimático UV) e creatinina (Labtest) para a avaliação da função renal; transaminase glutâmico oxalacética (TGO) e transaminase glutâmico pirúvica (TGP) (cinético-UV-IFCC), fosfatase alcalina (método – Roy – modificado) e gama GT (método – Szasz modificado) para avaliar a função hepática e proteínas totais e frações.

Os níveis de Gama GT foram mensurados utilizando (método – Szasz modificado) com o seguinte procedimento: em um tubo rotulado como teste foi colocado 1,0 ml do reagente de trabalho, adicionado em seguida 0,05 ml de amostra de cada trabalhador, homogeneizado e transferido imediatamente para cubeta termostaticada a $37 \pm 0,2$ °C. Esperou-se 1 minuto e fez-se a leitura da absorbância inicial (A1) em 405 nm, disparando simultaneamente o cronômetro e repetida a leitura após 2 minutos (A2). As leituras foram expressas em mg/mL e comparadas com os valores de referência.

Os níveis de creatinina pela metodologia (Labtest) foram dosados conforme descrito: Foram preparados dois tubos de ensaio identificados como branco e teste. Foi colocado 2,0ml de tampão, no tubo branco acrescentado 0,25ml de água deionizada, no tubo identificado como teste 0,25 mL de soro do trabalhador. Em seguida acrescentou nos tubos 0,5 ml de ácido pícrico e 0,1 mL do acidificante. Os reagentes foram misturados e colocados em banho-maria a 37 °C, durante 10 minutos, com o nível da água no banho superior ao nível dos reagentes nos tubos de ensaio, em temperatura ambiente durante 5 minutos. As absorbâncias do teste (A1 e A2) foram feitas no padrão de 510 nm ou filtro verde (500 a 540 nm), acertando o zero com o branco. As leituras foram expressas em mg/mL e comparadas com os valores de referência.

Os níveis de fosfatase alcalina foram mensurados através do método Roy modificado pela seguinte metodologia: Pipetou-se 1,0 mL do reagente de trabalho em um tubo 12x75 rotulado como teste e foi adicionado 0,02 mL de amostra, homogeneizado e transferido imediatamente para a cubeta termostaticada a 37 °C. Após 30 segundos a leitura da absorbância inicial (A₁), disparando simultaneamente o cronômetro foi feita e repetida após 2 minutos (A₂). As leituras foram expressas em mg/ml e comparadas com os valores de referência.

Para avaliação dos níveis de uréia (Enzimático – UV), foi realizado o seguinte procedimento: em um tubo rotulado como teste, foi colocado 1,0 ml do reagente de trabalho, adicionado em seguida 0,01 ml de amostra de cada trabalhador, homogeneizado e transferido imediatamente para cubeta termostaticada a $37 \pm 0,2$ °C. Disparado o cronômetro foi medida a absorbância aos

30 e 90 segundos. Usando a diferença de absorvância entre as duas temperaturas (A30 – A90), para calcular os resultados. As leituras foram expressas em mg/ml e comparadas com os valores de referência.

Os níveis de TGO e TGP (cinético-UV-IFCC) foram mensurados conforme o protocolo: em um tubo rotulado como teste, foi colocado 1,0 mL do reagente de trabalho, adicionado em seguida 0,1 mL de amostra de cada trabalhador, homogeneizado, após 1 minuto, transferido imediatamente para cubeta termostaticada a $37 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$. Registrada absorvância inicial A1 e disparado simultaneamente o cronômetro. As leituras foram expressas em mg/ml e comparadas com os valores de referência.

Os níveis de butirilcolinesterase plasmática foram determinados, utilizando-se a metodologia Dietz modificado e automatizado empregada no Equipamento Modular P 800 Hitache da Roche.

A metodologia aplicada para dosagem de butirilcolinesterase (BChE) foi realizada da seguinte forma. Inicialmente procedemos a identificação de 2 tubos de ensaio com B (branco) e T (teste), adicionamos aos mesmos 1,0 mL de substrato e 3,0 mL de reagente de cor. Colocou-se em banho-maria, 37°C , durante 3 minutos. Foi adicionado 20 μL de amostra no tubo T e incubado durante 2 minutos e 30 segundos. Após esse tempo de incubação e ainda no banho-maria, foi adicionado 3 mL de solução inibidora no tubo T em intervalos de 30 segundos entre os tubos. Retirado da estante de tubos do banho-maria e adicionado 3 mL de solução inibidora e 20 μL da amostra no tubo B. Homogeneizado para as leituras das absorvâncias do T (teste) em espectrofotômetro ou fotocolorímetro em 410 nm, acertando o zero com o branco. A cor final permaneceu por 15 min, a temperatura ambiente ($20 - 30^{\circ}\text{C}$). As leituras foram expressas em mg/mL e comparadas com os valores de referência.

Para a avaliação das proteínas totais, utilizou-se a metodologia de Biureto. Este tem como princípio o fato de que os íons de cobre em meio alcalino (reagente de Biureto) reagem com as ligações peptídicas das proteínas séricas formando uma cor púrpura. A sua absorvância máxima é de 545 nm, proporcional à concentração das proteínas na amostra.

A metodologia aplicada para a mensuração de albumina no soro foi a de verde de bromocresol. A albumina tem a propriedade de se ligar a uma grande variedade de ânions orgânicos e moléculas complexas de corantes. O sistema de medição baseia-se no desvio de pico da absorvidade máxima de um corante complexo (verde de bromacresol) quando se liga a albumina. A cor formada é medida colorimetricamente entre as faixas 600 e 640 nm. Para se calcular a fração de globulina utilizou-se como base o valor adquirido da proteína total e da albumina de cada trabalhador.

4.9 Avaliação Genotóxica

A avaliação de danos induzidos ao material genético pelas misturas complexas de agrotóxicos foi realizada com as aplicações da técnica da eletroforese em gel de células individualizadas (SCGE), ensaio cometa. É uma técnica simples, rápida e sensível para mensurar extensão de quebras no DNA em um pequeno número de células. As células são embebidas em agarose e colocadas em lâminas, onde são lisadas com detergentes e submetidas à eletroforese, onde é possível avaliar os danos ao DNA pela sua migração em forma de cauda, que são observadas ao microscópico, indicando a frequência de quebras e danos de bases.

Na versão alcalina é possível incluir os sítios apurínicos e apirimidínicos os quais são sítios álcis lábeis. É possível avaliar a conexão entre danos ao DNA causados por agentes oxidantes (DUSINSKA; COLLINS, 2008). Pode ser usado para biomonitoramento ambiental, ocupacional, e para acompanhamento clínico de tratamentos quimioterápicos e radioterápicos. A técnica usada nesta pesquisa é a versão alcalina de Singh *et al.* (1988), conforme Saran *et al.* (2008).

4.9.1 Teste Cometa em Células de Mucosa Bucal

Desenvolvido segundo Singh *et al.* (1988) e, posteriormente, modificado por Anderson *et al.* (1994). É uma importante ferramenta utilizada nos estudos de biomonitoramento populacional (FAUST *et al.*, 2004).

As amostras de células esfoliadas de mucosa bucal (**Figura 12**) de cada paciente foram centrifugadas por 10 minutos (1500 rpm), em três lavagens, a primeira com solução salina a 0,9% NaCl e as duas seguintes com PBS. As lâminas foram pré-cobertas por solução de agarose de ponto de fusão normal a 0,75%. Posteriormente, foram mantidas em temperatura ambiente até a solidificação da agarose. Esta camada foi utilizada para promover a adesão da segunda camada de agarose de baixo ponto de fusão. Foram retirados 30 µL de células esfoliadas de mucosa bucal suspensas em PBS e misturadas com 110 µL de agarose *low melting*, a 37°C e colocadas em forma de gotas sobre as lâminas, e cobertas com as lamínulas (24 x 60 mm), mantidas em baixa temperatura por 30 min até solidificar a agarose. Depois, a lamínula foi retirada e a lâmina mergulhada em solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1% Triton X-100, 10 % DMSO; pH 10) a 4°C e protegida da luz por no mínimo 24 horas. Ao serem removidas da solução de lise, as lâminas foram colocadas na posição horizontal na cuba de eletroforese. Esta estava em um banho de gelo, para manter a temperatura da eletroforese constante em torno dos 4°C. A cuba foi, então, preenchida com a solução de eletroforese (1 mM EDTA, 300 mM NaOH; pH > 13) recém-preparada, a um nível superior (0,25 cm, em média) às lâminas, ficaram em repouso por 20 min para o desenrolamento do DNA, o afrouxamento de suas ligações e a exposição dos sítios álcali-lábeis. A eletroforese foi conduzida usando 25 V e 300 mA, por 15 min. Todos estes passos foram realizados na presença de baixa luminosidade. Após a eletroforese, as lâminas foram retiradas da cuba e mergulhadas na solução de neutralização (0,4 M tris; pH 7,5, por 5 min) 3 vezes. As lâminas foram fixadas por 10 min em solução fixadora (Ácido tricloroacético 15%; Sulfato de zinco heptahidratado 5% e Glicerol 5%), após secagem as lâminas foram coradas com solução de nitrato de prata (0,02%). Lavou-se 3x com água destilada, mantendo as lâminas nas cubetas; adicionou-se a solução de parada (ácido acético) nas cubetas deixando-as por 5 minutos, mais três lavagens com água destilada e deixada secar em bandejas. Imagens de 100 células foram selecionadas aleatoriamente (50 células de cada uma de duas lamínulas) por indivíduo.

As células foram contadas visualmente em cinco classes de acordo com o tamanho e intensidade dos nucleóides (de-0 intacto, ao máximo danificado-4). Um valor (Índice de Danos) foi atribuído a cada cometa de acordo com sua classe

(VILLELA *et al.*, 2006). O índice de dano, portanto, variou de 0 (completamente intacto: 100 células × 0) para 400 (com dano máximo: 100 × 4 células) (COLLINS, 2004; MOURA *et al.*, 2007). Os cálculos dos dados foram feitos segundo as fórmulas: ID = número de dano de cada uma das classes x categoria da classe / 100; FD = 100 % – os danos da classe zero (ANEXO E).

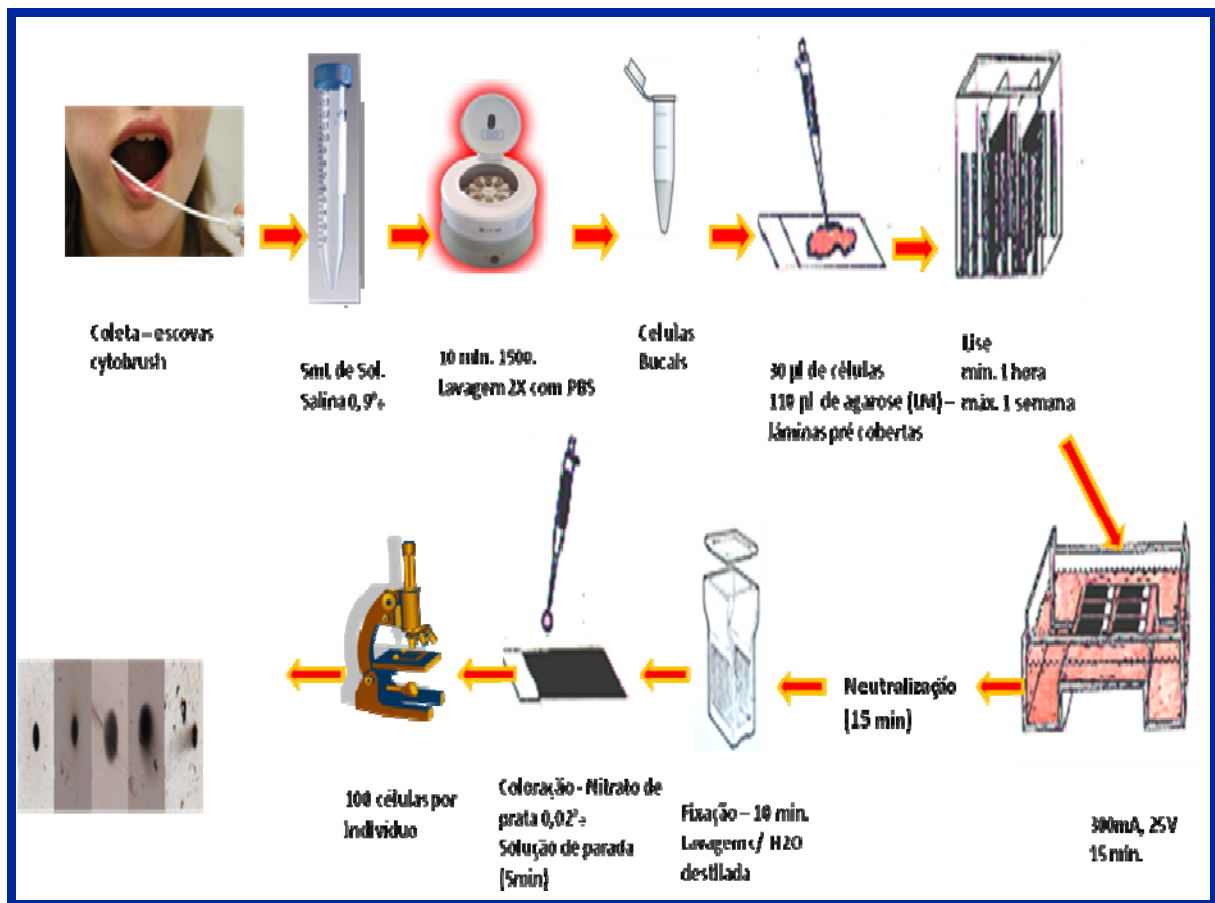


Figura 12. Esquema do teste de cometa conforme protocolo de Singh *et al* (1988) usado para a avaliação de genotoxicidade em agricultores expostos aos agrotóxicos.

A avaliação visual (**Figura 13**) dos cometas é um método validado que tem uma alta correlação com a análise de imagens por computador (COLLINS, 2004). A análise, feita pelo padrão de escores, onde, de acordo com o tamanho e intensidade da cauda do cometa, os mesmos foram divididos em cinco categorias (0-4) de acordo com a percentagem de DNA na cauda do cometa, que indica o grau de lesão sofrido pela célula: 0 = sem danos (<5%); 1 = baixo nível de danos (5-20%); 2 = médio nível de danos (20-40%); 3 = alto nível de danos (40-95%); 4 = dano total

(95%). O controle negativo foi processado separado das amostras dos agricultores e ambos analisados por dois examinadores.

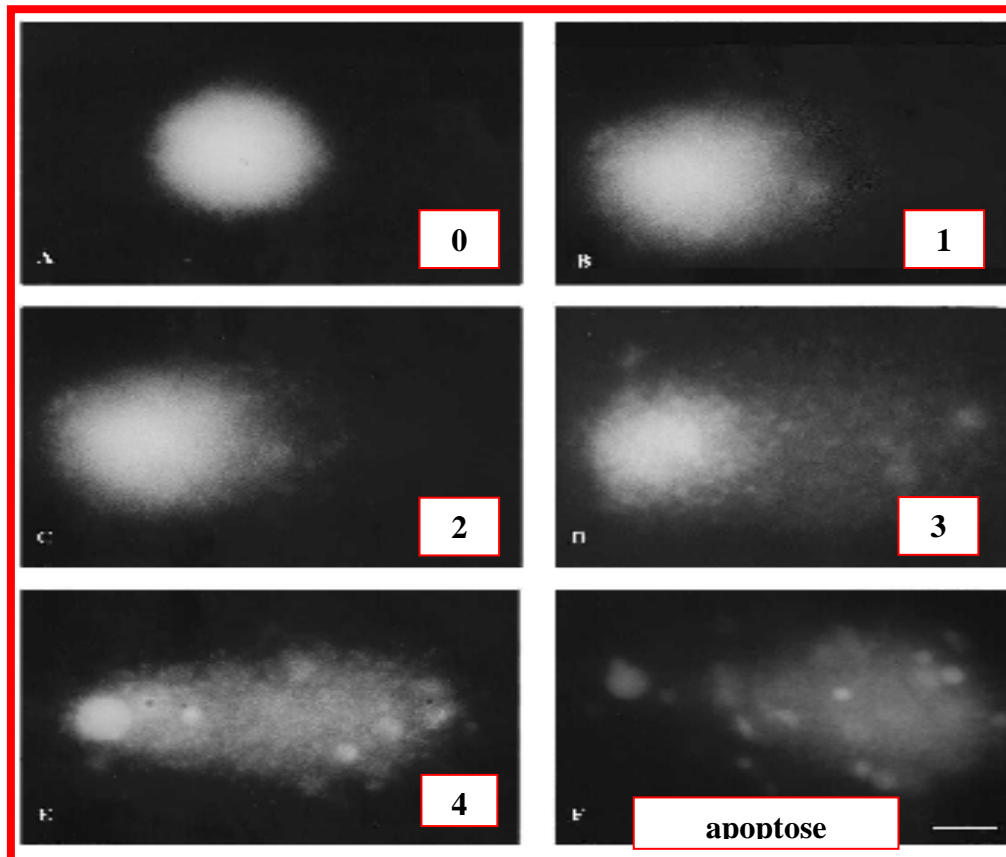


Figura 13. Classes de Danos ao DNA analisadas no Teste Cometa.
Fonte: Adaptado de Villela et al., 2006.

4.9.2 Teste do cometa em linfócitos de sangue periférico

As amostras de sangue de cada indivíduo foram coletadas através de punção venosa, cerca de 5 mL de sangue periférico com seringa estéril e descartável, contendo o anticoagulante heparina sódica 5000 U/ml. Do sangue heparinizado 100 μ L foi colocado em 5 mL de meio RPMI 1640 (na concentração final de 9%), adicionado 13,25% de DMSO. Foram estocadas no freezer a -80° C e antes do processamento foram colocadas no banho-Maria a 37° C, segundo Singh e Lai (2009). O teste Cometa foi realizado segundo Singh *et al.* (1988), com modificações de Tice *et al.* (2000), com adaptações de Da Silva *et al.* (2008). As lâminas foram pré-cobertas por solução de agarose de ponto de fusão normal a

0,75%. Posteriormente, foram mantidas em temperatura ambiente até a solidificação da agarose. Esta camada foi utilizada para promover a adesão da segunda camada de agarose de baixo ponto de fusão. As amostras foram centrifugadas a 900 rpm, o sobrenadante descartado e 5 µL do centrifugado foi misturado com 95 µL (0,75%) de agarose de baixo ponto de fusão (low melting), a 37°C e colocadas em forma de gotas sobre as lâminas, e cobertas com as lamínulas (24 x 60 mm), mantidas em baixa temperatura por 5 min até solidificar a agarose. Depois, a lamínula foi retirada e a lâmina mergulhada em solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1% Triton X-100, 10 % DMSO; pH 10) a 4°C e protegida da luz por no mínimo 24 horas. Ao serem removidas da solução de lise, as lâminas foram colocadas na posição horizontal na cuba de eletroforese. Esta estava em um banho de gelo, para manter a temperatura da eletroforese constante em torno dos 4°C. A cuba foi, então, preenchida com a solução de eletroforese (1 mM EDTA, 300 mM NaOH; pH > 13) recém-preparada, a um nível superior (0,25cm, em média) às lâminas, ficaram em repouso por 20 min para o desenrolamento do DNA, o afrouxamento de suas ligações e a exposição dos sítios alcali-lábeis.

A eletroforese foi conduzida usando 25 V e 300 mA, por 15 min. Todos estes passos foram realizados na presença de baixa luminosidade. Após a eletroforese, as lâminas foram retiradas da cuba e mergulhadas na solução de neutralização (0,4 M tris; pH 7,5, por 5 min). As lâminas foram fixadas por 10 min em solução fixadora (Ácido tricloroacético 15%; Sulfato de zinco heptahidratado 5% e Glicerol 5%), após secagem das lâminas foram coradas com solução de nitrato de prata (0,02%). Lavou-se 3x com água destilada, mantendo as lâminas nas cubetas, Adicionou-se a solução de parada (ácido acético) nas cubetas deixando-as por 5 minutos, mais três lavagens com água destilada e deixada secar em bandejas. Imagens de 100 células foram selecionadas aleatoriamente (50 células de cada uma de duas laminas) por indivíduo (**Figura 14**).

Para verificação da ocorrência de cometas em trabalhadores rurais no Estado do Piauí, um total de 15.200 linfócitos foram analisados, a partir da cultura de linfócitos do sangue coletado dos indivíduos pesquisados. Foram contabilizadas 100 células (50 células/lâmina) por indivíduo (ANEXO E).

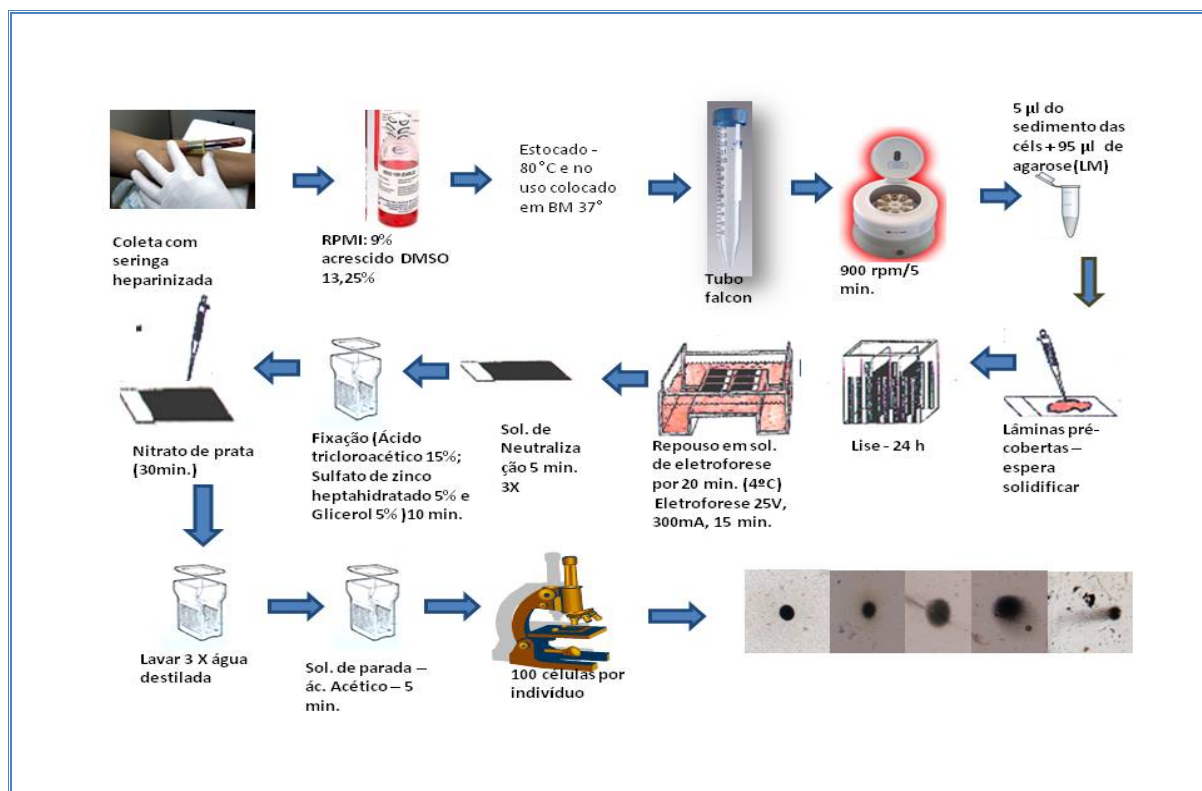


Figura 14 Esquema do teste de cometa em cultura de linfócitos conforme protocolo de Singh *et al* (1988), Tice *et al.* (2008), Da Silva *et al* (2008) usado para a avaliação de genotoxicidade em agricultores expostos aos agrotóxicos.

4.10 Avaliação mutagênica

A avaliação da mutagenicidade em agricultores expostos aos agrotóxicos foi realizada com os testes citogenéticos de micronúcleo em células esfoliadas do epitélio bucal em cultura de linfócitos com bloqueio e citocinese, como também, pelo teste de aberrações cromossômicas, em cultura de linfócitos.

4.10.1 Teste de micronúcleo em células esfoliadas de epitélio bucal

Os MNs representam marcadores simples, e são considerados valiosos na avaliação de danos citogenéticos de populações ocupacionalmente expostas a agrotóxicos. O teste de MN (**Figura 15**) foi realizado nas células epiteliais da mucosa oral de acordo com Sailaja *et al.* (2006) e Holland *et al.* (2008). A coleta de células bucais foi obtida através de fricção na bochecha dos indivíduos com escova

cytobrush. As células foram coletadas em tubos falcon contendo 5 mL de solução salina (0,9 %) e transportada para processamento no Laboratório de Toxicologia e Genética Molecular LAB-TOXIGEN do LACEN-PI. Após três lavagens, a primeira com salina e as duas seguintes com PBS por centrifugação à 1500 rpm por 10 min, com a retirada do sobrenadante entre as centrifugações, 50 µL de suspensão de células foram gotejadas sobre lâminas pré-aquecidas (37° C) em chapa aquecedora. Em seguida as células foram fixadas com metanol: ácido acético (3:1) durante 15 min, e dispostas horizontalmente à temperatura ambiente por 24 horas. Após esse período, as lâminas foram colocadas em água destilada por 1 minuto para hidratação das células, antes de realizar a coloração.

As células foram coradas com Giemsa 10% durante 15 minutos. Realizou-se a lavagem das lâminas por duas vezes com água destilada durante 3 minutos para retirar o excesso do corante. Após secas, as lâminas foram examinadas em microscopia óptica, com o aumento de 1000 X. Foram contadas cerca de 2.000 células para cada indivíduo. Os critérios de identificação do MN foram os descritos por Sarto *et al.* (1987) e por Tolbert *et al.* (1991,1992), como estruturas que apresentem distribuição cromatínica e coloração igual (ou mais clara) do que a do núcleo, que estejam no mesmo plano que este, apresentem limites definidos e semelhantes aos nucleares e o seu tamanho não ultrapassar 1/3 do tamanho do núcleo. Foram computadas apenas células que apresentem citoplasma íntegro e quando o MN se encontrar distintamente separado do núcleo principal. As anormalidades nucleares pertinentes à apoptose e citotoxicidade foram identificadas respectivamente, como CX, que é a fragmentação nuclear; CL, que caracteriza a dissolução nuclear, e células binucleadas (BN) de acordo com Holland *et al.* (2008) (ANEXO E).

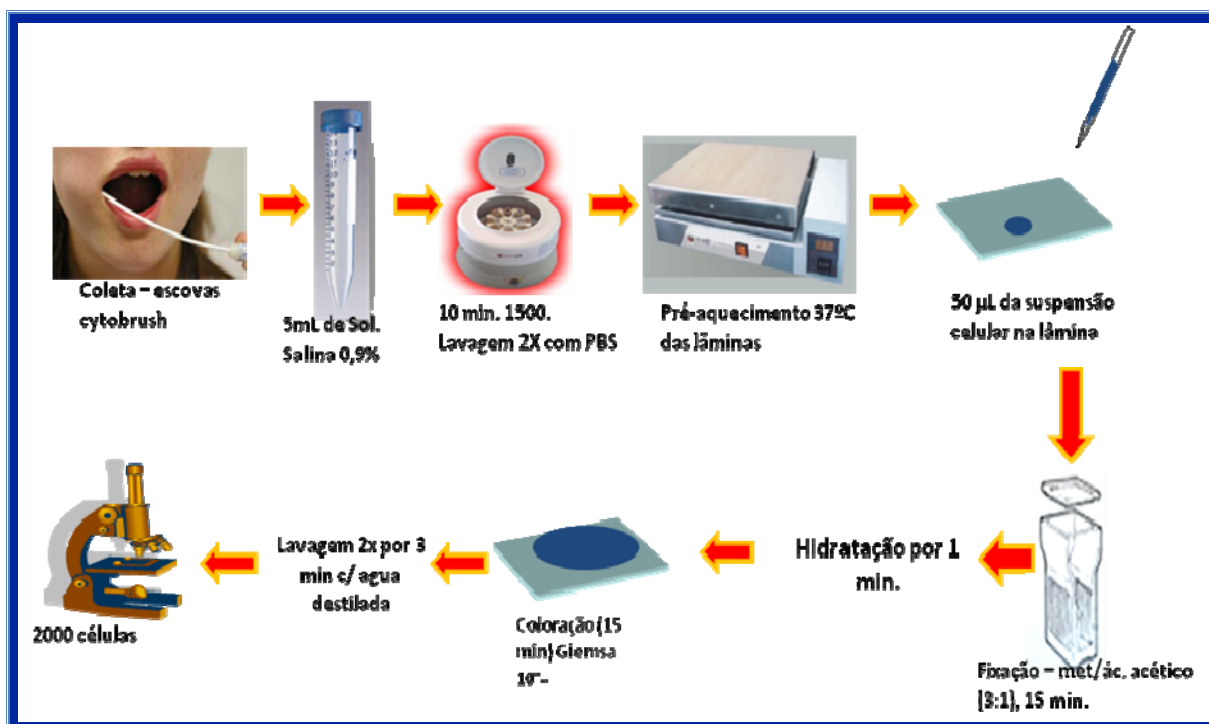


Figura 15. Esquema do Teste de MN em mucosa bucal representado segundo protocolo de

Fonte: Holland et al., 2008.

4.10.2 Teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese

Os MN com bloqueio de citocinese (CBMN) são pequenos corpúsculos compostos por material cromossômico. Após a separação das cromátides no processo mitótico dois núcleos são reconstituídos, um em cada pólo. A membrana nuclear é refeita ao redor destes dois conjuntos de cromossomos. Mas se um cromossomo inteiro ou um fragmento cromossômico acêntrico não se integra ao novo núcleo (por não estar unido ao fuso), este também pode constituir um pequeno núcleo individual chamado micronúcleo. Os micronúcleos, então são estruturalmente pequenos núcleos representando o material genético que foi perdido pelo núcleo principal, como consequência de um dano genético que pode ser causado por agentes físicos, químicos ou biológicos, capazes de interferir no processo de ligação do cromossomo às fibras do fuso, ou que possa induzir a perda de material genético (cromossomos inteiros ou fragmentos) (DA SILVA, 2003).

O sangue foi coletado em venipuncture heparinizados e as seringas foram transportadas em posição vertical evitando calor e agitação a fim de prevenir hemólise. Cerca de 18 gotas de sangue foi colocado em 5 mL de RPMI 1640 suplementado com 15 % de soro bovino fetal, 1% de antibiótico (penicilina e estreptomicina), 1% de L-glutamina e 1% de fitohemaglutinina. Os linfócitos são incubados por 72 h em até 37°C. A citocalasina B foi preparada em DMSO na concentração de 6 mg/mL e estocada em 20°C. Essa solução foi adicionada na cultura em 44h. Após as 72h de incubação as culturas foram centrifugadas em 800 rpm por 5 min para eliminar as células vermelhas. As células lavadas em RPMI 1640 foram tratadas em um meio hipotônico por 2-3 min em 0,075 M KCL até 4°C. O procedimento foi feito por 3X. As células foram centrifugadas e adicionadas na solução com metanol-ácido acético 3:1 e gentilmente agitadas. Esse processo foi repetido por 3X. As células foram ressuspensas e colocadas em lâminas e coradas com GIEMSA a 10% em tampão fosfato a pH 6.8, por 10 min (**Figura 16**). As células foram observadas em microscopia óptica em objetivas de 100X e fotomicrografadas. 1000 células binucleadas com citoplasma preservado foram avaliadas quanto à frequência de micronúcleos. Foi calculado o índice de divisão nuclear (IDN), conforme a fórmula: $IDN = [M1 + 2(M2) + 3(M3) + 4(M4)] / NT$.

As células viáveis também foram avaliadas quanto a apoptose e necrose e o índice de divisão nuclear com citotoxicidade (IDNC) foi calculado de acordo com a fórmula: $IDNC = [apoptose + necrose + M1 + 2(M2) + 3(M3) + 4(M4)] / NT$ (Número de células com apoptose; número de células com necrose; M1-M4, número de células viáveis de 1 a 4 núcleos e NT, número total de células, segundo Salvadori *et al.* (2003) (ANEXO E).

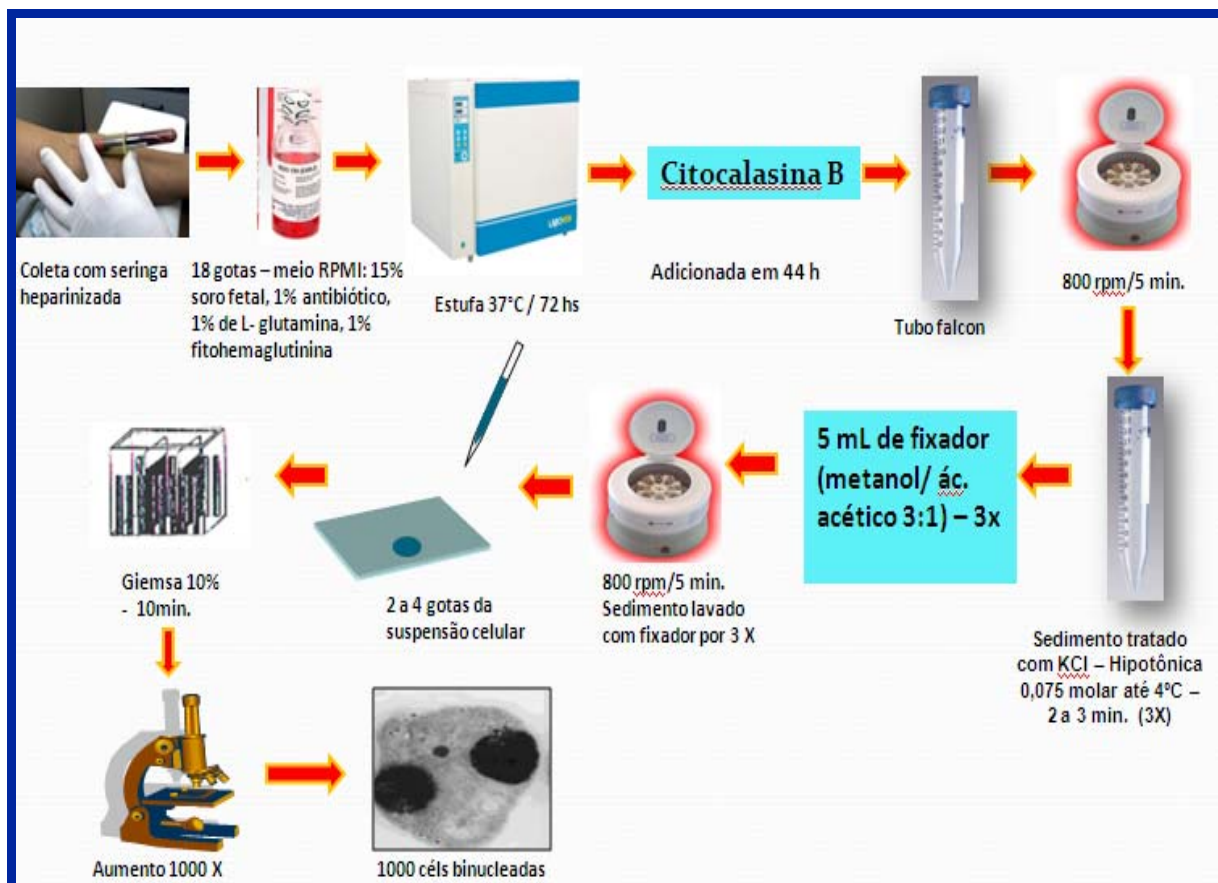


Figura 16. Esquema representativo do Teste de Micronúcleo com Bloqueio de Citocinese, desenvolvido segundo o protocolo de Salvadori *et al.* (2003).

4.10.3 Teste de aberrações cromossômicas em cultura de linfócitos

As preparações metafásicas para a análise convencional de AC foram efetuadas de acordo com Sram *et al.* (2007), seguindo os seguintes passos (**Figura 17**), através de punção venosa de cada indivíduo foram coletados cerca de 5 mL de sangue periférico com seringa heparinizada, estéril e descartável. Foram adicionadas 18 gotas do sangue em culturas de 5 mL de meio RPMI 1640, suplementado com 15 % de soro bovino fetal, 1% de antibiótico (penicilina e estreptomicina), 1% de L-glutamina e 1% de fitohemaglutinina(para estimular a divisão celular). As culturas foram incubadas em estufa comum a 37 °C por 72 horas. Adicionou-se a colchicina (16 µg/mL, Sigma), 2 horas antes de completar 48 horas de incubação para obtenção de células em metáfase. Após às 72 horas de incubação, a cultura de linfócitos foi transferida para um tubo falcon de 10 mL estéril e centrifugada a 800 rpm por 5 minutos, fazendo uma lavagem com solução

hipotônica (0,075 M) para rompimento das membranas celulares. Adicionou-se 5 mL de fixador, que consiste em metanol e ácido acético (3:1) e centrifuga-se.

As lâminas foram preparadas pelo método de Moorhead *et al.* (1960) modificado como descrito: para o preparo das lâminas, estas devem ser bem lavadas, ficando sem resíduo de gordura e imersas em água destilada a 4° C. Retira-se a lâmina da água e goteja-se a suspensão de células sobre a lâmina inclinada. O contato da água com a solução fixadora faz com que o material se espalhe sobre a lâmina com facilidade. As metáfases foram coradas com Giemsa (10%), diluído em tampão Sorensen para posterior visualização ao microscópio. Foram analisadas 100 metáfases/indivíduo bem espalhadas e sem sobreposição, em microscópio de luz e em objetiva de imersão. Dentre as AC foram avaliadas em 100 metáfases, identificadas em 300 células de cada indivíduo (ANEXO E).

Os cromossomos dicêntricos e tricêntricos, cromossomos em anéis e em anéis acêntricos, fragmentos cromossômicos, deleções terminais e deleções intersticiais foram identificados segundo Tolbert *et al.* (1991).

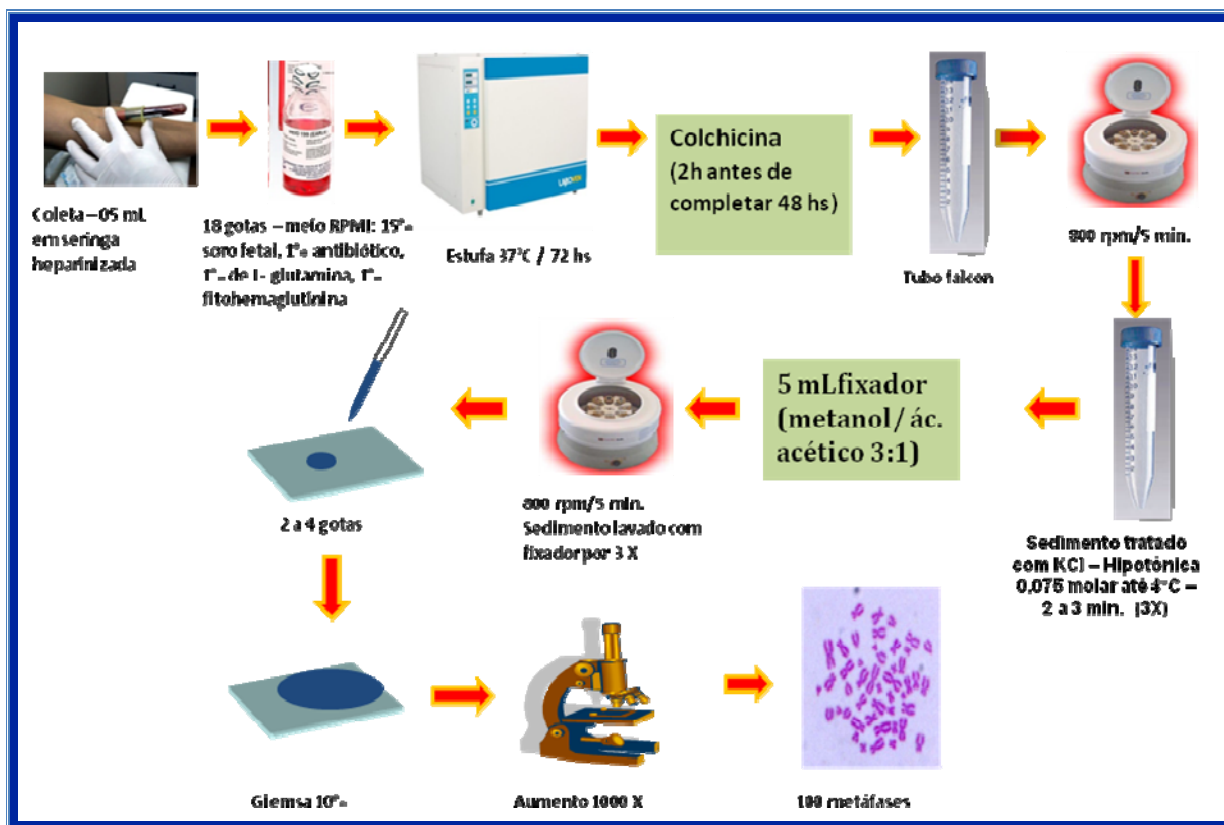


Figura 17. Esquema representativo do Teste de Aberrações Cromossômicas montado segundo o protocolo de Sram *et al.* (2007).

4.11 Avaliação Estatística

Os dados obtidos neste trabalho foram submetidos ao programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versão 13.0, para a análise de variância com o teste One - Way ANOVA não paramétrico e para as correlações Spearman's (rho) entre os diversos parâmetros analisados. O programa Prisma versão 4.0. com o teste Kruskal-Wallis foi usado para a comparação dos parâmetros hematológicos e o Teste t-Student, para comparações entre os indivíduos expostos com os não expostos, na avaliação bioquímica e genotóxica. Os níveis de significância adotados foram de 5% ($p < 0,05$), 1 % ($p < 0,01$) e 0,1 % ($p < 0,001$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Características da População

As características da população em estudo, obtidas a partir das informações apresentadas pelos sujeitos da pesquisa em respostas às indagações do questionário de saúde (ANEXO A), estão sumarizadas na **Tabela 6**, e informam sobre idade, tempo de trabalho, uso de EPI's e carga horária semanal.

A média de idade dos trabalhadores estudados foi de 40,37anos. O tempo de trabalho do grupo exposto foi em média de 19,32 anos, enquanto no grupo não exposto foi de 7,50 anos. Em relação à carga horária, o grupo exposto teve maior carga horária que o grupo não exposto, 41,38 horas versus 37,82. Esta situação enfrentada pelos trabalhadores piauienses, assemelha-se a relatada por Veiga *et al.* (2007), quando define que o trabalhador brasileiro chega a trabalhar mais de 12 horas por dia, 6 vezes na semana em temperatura externa que pode atingir 40 graus, estando sujeito a condição de trabalho bastante insalubre que pode trazer consequência negativa a sua saúde.

Tabela 6 Características da população exposta aos agrotóxicos nos Municípios do Piauí, ano de 2008 a 2010, comparado a não exposta.

Características da população	Expostos (N =97)	Não expostos (N =55)
Idade	40,37 ± 14,77 (18-69) ^a	32,13 ± 9,46 (20-69) ^a
Tempo de trabalho no local (anos)	19,32 ± 14,03 (1-54) ^b	7,50 ± 7,11 (1-31) ^b
Uso de EPIs		
• Sim	50,5%	-
• Não	39,2%	100%
• Não informado	10,3%	-
Carga horária semanal	41,38 ± 7,12 (10-50) ^c	37,82 ± 7,63 (0-50) ^c

Resultados expressos como média ± desvio padrão. ^aIntervalo de idade; ^bIntervalo de tempo; ^cIntervalo de horas.

Quanto às características do estilo de vida (**Tabela 7**), 33% do grupo exposto relatou ter o hábito de fumar, enquanto 14,5% do grupo não exposto tinha esse hábito. Resultado semelhante foi encontrado em outro estudo onde o percentual de fumantes no grupo exposto era maior do que os de não fumantes com 61,11% e 38,89% respectivamente (GROVER, 2003). Em relação ao etilismo, uma característica da população dos municípios pesquisados é o alto consumo de bebidas alcoólicas, observado no estudo em foco, pois 59,8% dos expostos relatou o consumo de álcool. Esses resultados são confirmados pela pesquisa realizada no sul do Estado do Piauí, em 2007, evidenciando que o percentual de trabalhadores que referiram história de consumo atual ou prévio de bebida alcoólica foi elevado, 55,83% (CHAVES, 2007).

Em relação ao consumo de medicamentos prescritos 34% dos agricultores faziam uso, enquanto 29,1% do grupo não exposto; já nos medicamentos não prescritos tivemos um consumo maior do grupo não exposto (67,3%) em relação ao grupo exposto (45,4%). Quanto à exposição aos raios X nos últimos dez anos, 27,8% dos expostos comparado com 67,3% dos não expostos (**Tabela 7**).

Quanto aos hábitos alimentares (**Tabela 8**) a população do grupo exposto relatou que consome habitualmente chá e café, diferente do consumo do grupo não exposto, fato explicado, devido a tradição da medicina natural em municípios da zona rural. Em relação ao consumo de carne, os valores obtidos para os grupos exposto e não exposto apresentaram resultados semelhantes (96,9% e 97,5%), enquanto que para os vegetais observou-se baixo consumo nos dois grupos (32% e 21,8%). Em pesquisa no Estado do Piauí, realizada por Chaves (2007) quanto aos hábitos alimentares 98% comem carne, 74,5% bebem refrigerante e 97% não costumam consumir vegetais. O consumo de vegetais é tratado como hábito conservador da estabilidade genética podendo fornecer vitaminas antioxidantes que combatem as espécies reativas de oxigênio (ERO) (ERDTMANN, 2003).

Tabela 7 Características do estilo de vida da população, exposta e não exposta aos agrotóxicos, em municípios do Piauí, ano de 2008 a 2010.

Características da população	Expostos aos agrotóxicos (N =97)	Não expostos (N =55)
Hábito de fumar <ul style="list-style-type: none"> • Não • Sim 	67% 33%	85,5% 14,5%
Tempo de Tabagismo (anos)	9,70 ±12,30 (1-53)	4,11 ± 5,51 (1-24)
Etilismos <ul style="list-style-type: none"> • Sim • Não 	59,8% 40,2%	74,5% 25,5%
Consumo de medicamentos Prescritos <ul style="list-style-type: none"> • Sim • Não 	34,0% 63,9%	29,1% 58,2%
Não prescritos <ul style="list-style-type: none"> • Sim • Não • Não informado 	45,4% 52,6% -	67,3% 23,6% -
Vitaminas nos últimos seis meses <ul style="list-style-type: none"> • Sim • Não 	25,8% 74,2%	18,2% 58,2%
Vacinas nos últimos dozes meses <ul style="list-style-type: none"> • Sim • Não 	54,6 % 45,4%	61,8% 38,2%
Raios X nos últimos 10 anos <ul style="list-style-type: none"> • Sim • Não 	27,8% 72,2%	67,3% 32,7%

Resultados expressos como média ± desvio padrão, percentual e Intervalo de tempo.

Tabela 8 Características alimentares da população exposta e não exposta aos agrotóxicos em municípios do Piauí, ano de 2008 a 2010.

Características da população	Expostos (N =97)	Não expostos (N =55)
Consumo de vegetais		
• Sim	32,0%	21,8%
• Não	68,0%	78,2%
• Não informado	-	-
Uso de adoçantes		
• Sim	6,2%	45,5%
• Não	93,8%	54,5%
Consumo de carne		
• Sim	96,9%	97,5%
• Não	3,1%	2,5%
Bebe café		
• Sim	86,6%	60,0%
• Não	13,4%	40,0%
Bebe chá		
• Sim	62,9%	21,8%
• Não	37,1%	78,2%

No momento da entrevista, ao serem indagados sobre a exposição aos agentes químicos no trabalho, os trabalhadores relataram que se expõem a vários tipos de agrotóxicos, sendo comum, um mesmo trabalhador, citar mais de um tipo de “veneno”, que é como eles se referiam aos agrotóxicos.

Na **Figura 18** e **Tabela 9** estão apresentados os principais agrotóxicos utilizados pelos agricultores piauienses indicados pelo grupo exposto. Os grupos químicos mais utilizados pelos trabalhadores rurais são: herbicidas (53,5%), carbamatos (2,7%), organofosforados (13,0%), piretróides (7,6%) e organoclorados (3,4%) e neonicotinóide (17,1%). Muitas dessas classes são classificadas pela Agência Internacional do Câncer (IARC, 1991), como potentes genotóxicos e carcinógenos. Resultados semelhantes foram encontrados em estudo realizado no Mato Grosso, onde o maior percentual de agrotóxicos utilizados foi de herbicidas (CAIRES, 2002).

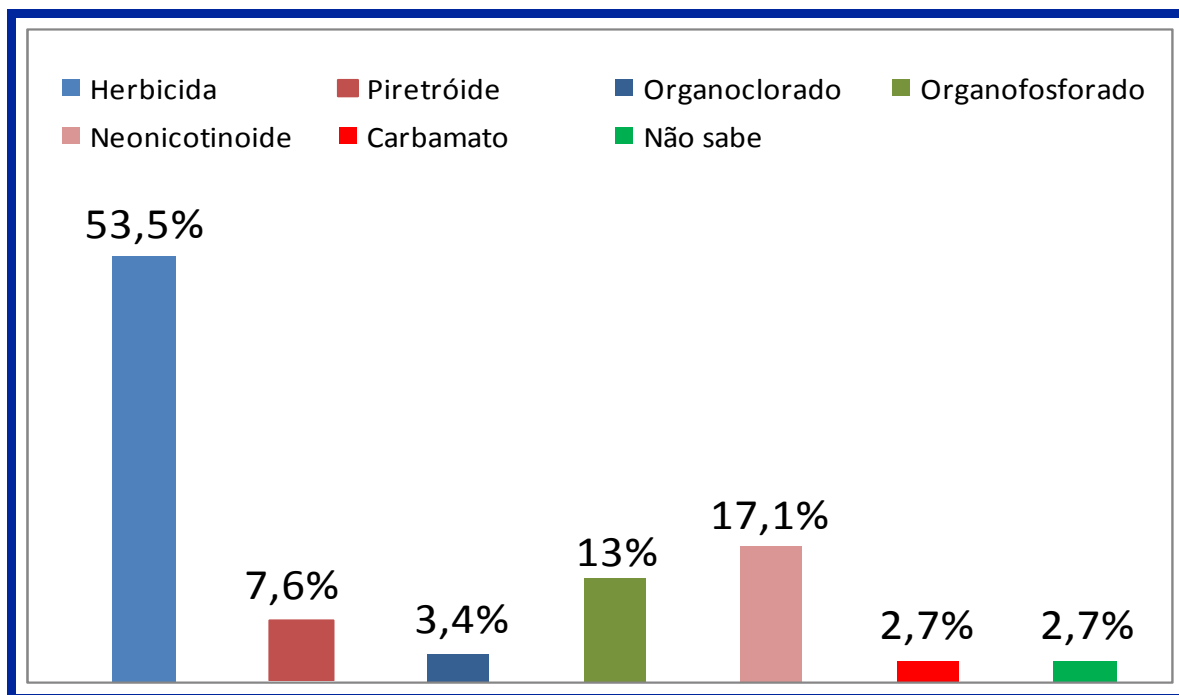


Figura 18. Percentual de agrotóxicos, segundo grupo químico, utilizados pelos agricultores em municípios do Piauí nos anos de 2008 a 2010.

Dentre os herbicidas (fenoxiacéticos, dipiridilos ou bipiridilos, dinitrofenóis e pentaclorofenol, glicina substituída), o glifosato foi o principal ingrediente ativo citado pelos trabalhadores piauienses (46,6%). É importante lembrar que as formulações do glifosato contêm um ou mais surfactantes (ou tensioativos), e a polioxietilenoamina (POEA, alcilamina etoxilada de cadeia longa) é o mais usado deles. A POEA é muito irritante e significativamente mais tóxico (2 a 3 vezes mais) do que o glifosato puro. Por outro lado, sabe-se que o maior derivado deste ingrediente ativo, o ácido aminometilfosfônico ou AMPA, também é tóxico para o organismo. O glifosato é irritante dérmico e ocular, podendo causar danos hepáticos e renais quando ingerido em doses elevadas. O composto é absorvido por via oral e dérmica, sendo excretado principalmente na urina. A excreção biliar, no entanto, é limitada e a eliminação através de ar expirado é muito baixa (AMARANTE JR *et al.*, 2002).

Tabela 9 Tipos de Agrotóxicos referidos pelos trabalhadores rurais nos municípios piauienses pesquisados no ano de 2008 a 2010.

*Nome referido	Ingrediente ativo	Tipo de ação	Grupo Químico	Classe Toxicológica	Nº	%
2,4 D	2,4 D	Herbicida	Ácido ariloxialcanóico	I	2	1,4
DMA	2,4 D	Herbicida	Ácido ariloxialcanóico	I	2	1,4
Karate	Lambda-cialotrina	Inseticida	Piretróide	III	3	2,1
Propanil	Propanil	Herbicida	Anilida	II	3	2,1
Tordon	2,4D + Picloram	Herbicida	Ácido piridinocarboxílico	I	3	2,1
Lannate	Metilcarbamato de oxina	Inseticida	Carbamato	II	4	2,7
Endossulfan	Endossulfan	Inseticida	Organoclorado	I	5	3,4
Nuvacron	Monocrotopos	Inseticida	Organofosforado	III	7	4,8
Agritoato	Dimetoato	Inseticida	Organofosforado	I	12	8,2
Nitrosin	Cipermetrina	Inseticida	Piretróide	II	8	5,5
Roundup	Glifosato	Herbicida	Glicina substituída	IV	19	13,0
Actara	Thiamethoxam	Inseticida	Neonicotinoide	III	25	17,1
Glifosato	Glicina substituída	Herbicida	Glicina substituída	IV	49	33,6
Não sabe	-	-	-	-	4	2,7
TOTAL					146	100,0

* Nome do produto referido pelo trabalhador. Nº=Número de vezes em que o agrotóxico foi citado pelo trabalhador.

Os dados divulgados em 2009, pela Associação Nacional de Defesa Vegetal (ANDEF), mostram que, no Brasil, os herbicidas respondem pelo consumo de 3.200 milhões de toneladas (44,9%). O segundo maior consumo é de inseticidas, 2,027 milhões de toneladas (28,5%); em seguida, estão os fungicidas, com 1,573 milhões de toneladas (22,1%); os acaricidas, 112,8 mil toneladas (1,6%), e os demais defensivos agrícolas, que somam 210,1 mil toneladas (2,9%) (MENTEM, 2009). Os dados obtidos na nossa pesquisa são semelhantes, pois encontramos uma frequência elevada das classes dos herbicidas seguida pelos inseticidas.

Em 2009, analisaram-se os efeitos do glifosato sobre o material genético através da medida das aberrações cromossômicas e micronúcleos em camundongos. O estudo comprovou o efeito de lesões importantes e morte celular (SAHDEO *et al.*, 2009). Existem suspeitas de mutagenicidade, teratogenicidade e carcinogenicidade relacionados aos herbicidas. Estudos epidemiológicos demonstram diversas associações entre o uso de agrotóxicos e câncer em humanos, incluindo linfoma não Hodgkin e câncer de tireóide. Entretanto, os

herbicidas têm sido avaliados genotoxicamente por meios de diferentes biomarcadores, tais como os usados nesse estudo, a exemplo dos testes de cometa, MN e AC e trocas de cromátides irmãs e muito deles apresentam propriedades genotóxicas (GRISOLIA, 2002; MASTRANGELO *et al.*, 2005).

Em relação à utilização de inseticidas, nesta pesquisa, a maior utilização foi para o Actara (17,1%) e o Agritoato (8,2%) (**Tabela 9**), o que parece ser muito comum na cultura utilizada pelos municípios piauienses pesquisados, pois, este resultados se assemelham aos encontrados na região no Vale do São Francisco – PE, a classe de agrotóxicos mais utilizada foi Inseticida, que oferece o maior potencial para agravos agudos à saúde (BEDOR *et al.*, 2008).

O Actara (tiametoxam) é um inseticida pertencente à classe dos neonicotinóides, recentemente registrado no Brasil para o controle de pragas em várias culturas, pouco tóxico, contudo perigoso para o ambiente. Entretanto, quando em contato constante, mesmo em pequenas doses, esse inseticida tem grande potencial carcinogênico (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

Foi evidenciado em nossa pesquisa que 7,5% de agricultores utilizavam piretróide, dentre eles, o Karate que é um inseticida altamente tóxico e perigoso para o ambiente. Os sintomas de intoxicação aguda ocorrem principalmente quando sua absorção se dá por via respiratória, incluindo entre os sintomas: dormência nas pálpebras e nos lábios, irritação das conjuntivas e mucosas, espirros, coceira intensa, manchas na pele, edema nas conjuntivas e nas pálpebras, excitação e convulsões. São estimulantes do sistema nervoso central e, em doses altas, podem produzir lesões no sistema nervoso periférico, não tendo evidências de toxicidade crônica com o uso de piretróides (MATOS *et al.*, 2002). Segundo Trapé (2005) neurites periféricas e alterações hematológicas do tipo leucopenias, são alguns dos efeitos da exposição de longo prazo.

Foi relatada ainda, a utilização do ingrediente ativo Endossulfan (3,4%) organoclorado usado pelos trabalhadores piauienses. Estudo de Bedor (2008), também encontrou em Pernambuco e na Bahia, produtos formulados a base de endossulfan, entre os mais vendidos para utilização na fruticultura, pelas lojas de

agrotóxicos dessa região, ressaltando que o produto não possui autorização para tal cultivo. O endossulfan permanece no ambiente por longos períodos de tempo, produzindo metabolitos tóxicos decorrentes de degradação no ambiente, por vezes mais tóxico que o próprio ingrediente ativo. O endossulfan, foi banido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), por intermédio de Resolução publicada em 2010 e não poderá ser comercializado a partir de 31 de julho de 2013, a determinação é fundamentada em estudos toxicológicos que associam o uso desse agrotóxico, considerado extremamente tóxico, a problemas reprodutivos e endócrinos em trabalhadores rurais e na população (ANVISA, 2010).

Como observado na **Tabela 9** as classes predominantes de agrotóxicos usados de acordo com os aspectos toxicológicos foram III e IV (**Figura 19**), moderadamente tóxica e levemente tóxica, respectivamente (WHO, 1990). De acordo com Garcia (2005), classificar um agrotóxico segundo sua periculosidade deveria servir como parâmetro para a definição de medidas de controle e de gerenciamento de riscos, porém, no Brasil, essa classificação é meramente figurativa, uma vez que não há diferença em um produto ser da Classe I — extremamente tóxico para o homem — ou da Classe IV — pouco tóxico para os seres humanos —, se eles podem ser recomendados, comercializados e utilizados da mesma forma e por qualquer usuário.

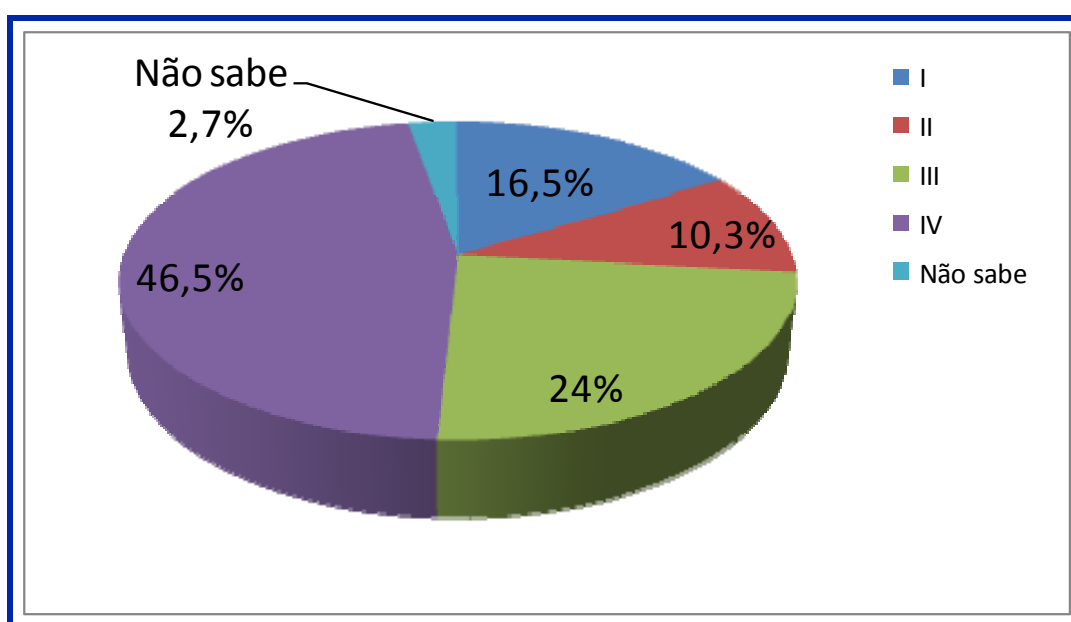


Figura 19. Percentual de agrotóxicos, segundo classe toxicológica, usados pelos agricultores do Piauí, nos anos de 2008 a 2010.

5.2 Avaliação Hematológica e Bioquímica

Com a pesquisa ficou constatado a importância de investigar a saúde geral dos pesquisados, estudando o hemograma, exame de rotina mais solicitado para iniciar uma investigação diagnóstica, e sendo o câncer uma doença que surge através de uma rede extremamente complexa de causas múltiplas, e que provavelmente será um desafio conhecer toda a gama ou combinações de agentes e entendendo que a prevenção à exposição a agentes cancerígenos pode evitar um dano de maior relevância à saúde. Sabemos que 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 agrotóxicos e seus reais riscos à população humana.

Neste contexto ainda não são muitos os conhecimentos sobre as causas ocupacionais e ambientais do câncer, somente em 2007, identificou 415 agentes cancerígenos conhecidos ou suspeitos. Segundo Titlic *et al.* (2008) após exposição aos agrotóxicos, vários distúrbios fisiológicos podem se manifestarem, dentre eles diminuição significativa do número de hemácias e leucócitos.

Em nosso estudo não houve significância entre os parâmetros hematológicos entre o grupo exposto e o grupo não exposto (**Tabela 10**) apesar de que 97 trabalhadores expostos pesquisados, destes 38 apresentaram um quadro de leucopenia (**Figura 20**) quando comparados com os valores de referência (ANEXO C), podendo ser classificado como cronicamente expostos aos agrotóxicos (**Tabela 6**).

Os trabalhadores que têm sido expostos a agrotóxicos 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; RAMOS, 2009) . Segundo Carvalho (1988), a ação inicial de exposição ao agrotóxico é 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.

Tabela 10 Avaliação dos parâmetros hematológicos em agricultores expostos aos agrotóxicos em municípios do Piauí, ano 2008 a 2010.

Grupos	Hematócrito(%)	Hemoglobina (g%)	Hemácias mm ³	Leucócitos mm ³
Expostos N=97	44.09 ± 3.41 (33 - 54)	14.91 ± 1.37 (11-18.4)	4.830 ± 0.41 (3.710 – 5.800)	5.430 ± 1.699 (1.170-9.870)
Não Expostos N=55	45.52 ± 2.70 (41 - 52)	15.54 ± 1.24 (13.40 – 17.60)	4.920 ± 0.288 (4.30 – 5.60)	5.758 ± 1.135 (4.700 – 9.800)

Média ± Desvio padrão. Dados entre parênteses correspondem ao intervalo dos parâmetros. Não Significância em relação aos trabalhadores não expostos analisados com o *Teste t*.

Estes resultados são semelhantes aqueles encontrados no estudo de Carvalho (1988), onde foi evidenciado que o período de exposição de 5 a 20 anos é possível ocorrer leucopenia. A leucopenia não poderá ser considerada como um único fator indicativo de uma doença específica, uma vez que pode ser influenciada por determinadas substâncias (agrotóxico), medicamentos tais como antiarrítmicos, antibióticos, anticonvulsivantes, anti-hipertensivos e os usados para tratamento do diabetes e o próprio câncer podem ser causas de leucopenia. Na pesquisa 34% dos expostos tomam medicamentos prescritos e 45,4% não prescritos. É importante destacar que a diminuição dos leucócitos gera também uma deficiência imunológica, deixando assim o indivíduo mais vulnerável a doenças oportunistas, que se não tratada pode levar o indivíduo a óbito (RAMOS, 2009).

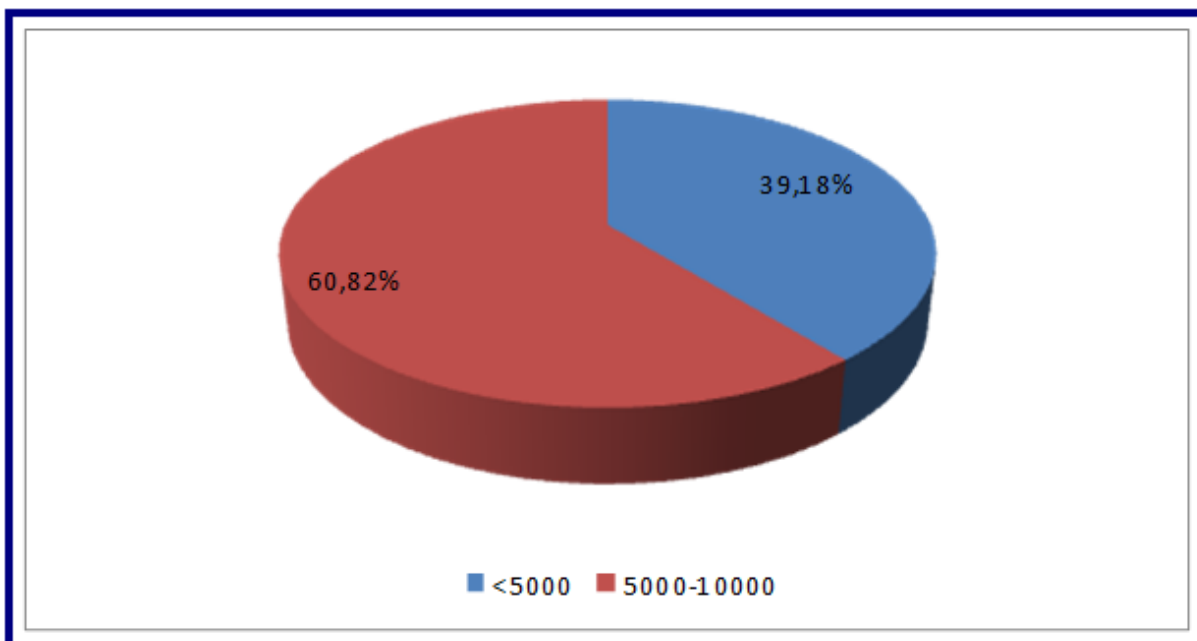


Figura 20. Avaliação de leucopenia em trabalhadores expostos aos agrotóxicos no Piauí nos anos 2008 a 2010.

Ratner *et al.* (1983) têm sugerido que presença de agrotóxicos nos alimentos e frutas consumidos diariamente poderia conduzir a aumento significativo de supressão de medula óssea em indivíduos normais. Além disso, esta exposição pode culminar em anemia aplástica (LAFIURA *et al.*, 2007; AHAMED *et al.*, 2006) e em leucemias (LAW *et al.*, 2006).

Estudando os casos de anemia aplástica adquirida (AAA) em doentes com uma história de exposição aos agrotóxicos de áreas agrícolas, para a evidência mais forte de um risco aumentado para leucemia mieloide está nos trabalhadores que fabricam e nos que aplicam agrotóxicos. Van Maele-Fabry *et al.* (2007) identificaram pacientes apresentando grau moderado a severo, em aplasia de medula óssea, como resultado decorrente de 9-12 anos de exposição prolongada a agrotóxicos, 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 foram 19 anos. Dado esse, que também corresponde a pesquisa realizada por Ramos (2009), em um município baiano.

Nesta pesquisa foi observado no eritrograma (série vermelha) hemácias, hematócrito e hemoglobina nenhuma alteração significativa, em relação aos não expostos, ressaltando apenas uma diminuição do percentual 10%, dentro do próprio grupo exposto o que caracteriza um início de uma possível anemia em alguns trabalhadores expostos à agrotóxicos. Elsadek e Hassan (1999) encontraram no grupo exposto aos agrotóxicos uma baixa de hemoglobina significativa quando comparado ao grupo controle, indicando também uma possível anemia. Estas observações foram reforçadas por Gamlin *et al.* (2007) e Titlic *et al.* (2008).

A exposição aos agrotóxicos é conhecida por produzir uma variedade de alterações bioquímicas, o qual pode ser responsável por efeitos adversos em estudos experimentais com humanos (HERNÁNDEZ *et al.*, 2006; LÓPEZ *et al.*, 2007).

Na avaliação dos parâmetros bioquímicos para uréia, proteínas totais e albumina não foi encontrada significância para o grupo exposto em relação ao grupo não exposto. No parâmetro creatinina, foi encontrado significância $p < 0,05$ (**Tabela 11**). Segundo a OPAS (1996), os herbicidas provocam lesões hepáticas, renais e fibrose pulmonar irreversível. Cabe ressaltar que as dosagens obtidas para os parâmetros supracitados também estão de acordo com os padrões de referência (ANEXO C).

Tabela 11. Avaliação dos parâmetros bioquímicos em agricultores expostos aos agrotóxicos em municípios do Piauí, ano 2008 a 2010.

Grupos	Uréia	Creatinina	Proteína total	Albumina
Expostos N=97	31.67 ± 8.80 (12-49)	0.95 ± 0.16* (0.60 -1,70)	7.59 ± 0.57 (6,30 – 8,40)	3.85 ± 0.26 (3,30 – 4,30)
Não Expostos N=55	28.92 ± 5.67 (16- 46)	0.94 ± 0.12 (0.70- 1.30)	7.72 ± 0.86 (6.00 – 8.90)	4.31 ± 0.33 (3.50 – 5.10)

Média ± Desvio padrão. Dados entre parênteses correspondem ao intervalo dos parâmetros.
*Significância $p < 0,05$ em relação aos trabalhadores não expostos avaliados com o teste t.

No presente estudo foram encontradas alterações significantes para a fosfatase alcalina ($p < 0,001$). As características individuais para fosfatase alcalina (**Figura 21**) indicam que nos indivíduos expostos a dosagem encontra-se elevada em relação aos não expostos, e acima dos valores de referência preconizado pela

literatura (ANEXO D), sugerindo alterações hepáticas significativas. Estudo realizado por Carvalho *et al.* (1988) detectou níveis significativamente mais elevados ($p < 0,01$) de fosfatase alcalina em aplicadores de BHC.

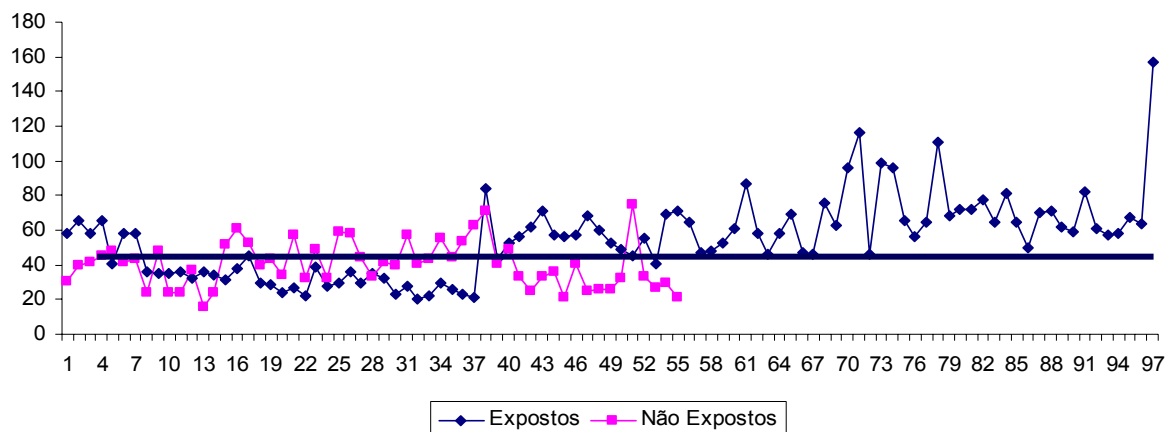


Figura 21. Perfil bioquímico para fosfatase alcalina em trabalhadores expostos e não expostos aos agrotóxicos no Piauí, no ano de 2008 a 2010. A linha contínua em azul indica o limite máximo do valor normal de referência (43 mg/dL).

Em agricultores expostos, hepatotoxicidade foi observada no presente estudo, para a dosagem da fosfatase alcalina. Estudos com inseticidas organoclorados em animais e humanos têm detectado hepatotoxicidade em altas e baixas doses, a qual pode desencadear uma indução das enzimas hepáticas (MARONI; FAIT, 1993). Segundo a OPAS (1996), a exposição prolongada a múltiplos agrotóxicos afeta diversos órgãos incluindo o fígado, podendo causar hepatite crônica, colescistite e insuficiência hepática. Considerando o tempo de exposição da nossa população estudada e categorizando-a como exposição crônica (média 19 anos), e carga horária (média 41 horas semanais), poderíamos inferir exposição suficiente para que as alterações hepáticas apresentassem-se fora dos valores de referência normais (**Tabela 12**).

Tabela 12. Avaliação dos parâmetros bioquímicos de função hepática, em agricultores expostos aos agrotóxicos em municípios do Piauí, ano 2008 a 2010.

Grupos	Fosfatase alcalina	Butiril colinesterase	TGO	TGP	Gama GT
Expostos N=97	54.65 ±22.99*** (20- 157)	8.013 ± 2.068* (800 – 12.00)	30.40 ± 8.21** (12 - 63)	35.23 ±13.01*** (16 – 86)	18.9 ± 12.2 (3- 69)
Não Expostos N=55	40.32 ± 13,26 (16 – 46)	9.667 ± 1.951 (4.950 –13.000)	26.94 ± 5.05 (17 – 34)	25.43 ± 5.58 (13.9 – 36)	22.34 ±11.93 (3-57)

Média ± Desvio padrão. Dados entre parênteses correspondem ao intervalo dos parâmetros Significância em *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$ em relação aos trabalhadores não expostos analisados com o *test t*.

Também são mostrados os dados obtidos relativos às dosagens de gama GT e BChE. Embora o resultado da gama GT não tenha sido estatisticamente significativa entre os grupos, houve um aumento em 6,2% dos expostos quando comparado ao valor de referência (7 a 40U/l). Segundo Almeida & Martins, (2008) esses valores podem se elevar com o consumo de álcool o fumo e o nível de atividade física, o que pode justificar as alterações encontradas em nossa pesquisa no grupo exposto (59,8%). Entretanto, valores significantes ($p < 0,05$) foram observados para a BChE em relação aos não expostos (**Tabela 12**). De forma contrária ao esperado, as alterações da BChE foram observadas para os não expostos. Somente alguns indivíduos expostos apresentaram inibição no percentual de cerca de 4%, valor não significativo, dentre eles o valor mais discrepante foi o outliers de 800 U/l. Este dado talvez esteja diretamente relacionado ao pouco uso na agricultura pelos trabalhadores piauienses de organofosforados e carbamatos (15,7%), responsáveis pela inibição da acetilcolinesterase. De forma similar estudos realizados com agricultores no Estado do Rio de Janeiro, após determinação individual das atividades de BChE plasmáticas e AChE eritrocitárias dos 55 indivíduos pertencentes ao grupo expostos foram considerados intoxicados, segundo a BChE, dois indivíduos (3,6%), e de acordo com os valores de AChE, 23 indivíduos (41,8%) foram considerados intoxicados (SILVA *et al.*, 2001).

Como relatado na literatura os agrotóxicos organofosforados são inibidores da colinesterase e são extensivamente utilizados na agricultura e programas de saúde comunitários. A inibição da colinesterase é um meio de monitorar a exposição à organofosforados (NGATEA; MGNEI, 1980). Eles podem causar hepatotoxicidade (TOMEI *et al.*, 1998). Cabe ressaltar que o fato das alterações acima do valor de referência para a BChE sugere outras patologias decorrentes ou não da exposição aos agrotóxicos (**Figura 22**). Embora este dado aparentemente indique um achado relevante, lembramos que a enzima butirilcolinesterase age inespecificamente, ou seja, atua hidrolisando outras proteínas além da acetilcolina. Segundo Araújo (2007) a colinesterase pode estar aumentada em pacientes obesos, em diabéticos e na síndrome nefrótica. Logo, é possível que os trabalhadores submetidos a esta pesquisa e a análise enzimática possam estar em um destes estados patológicos.

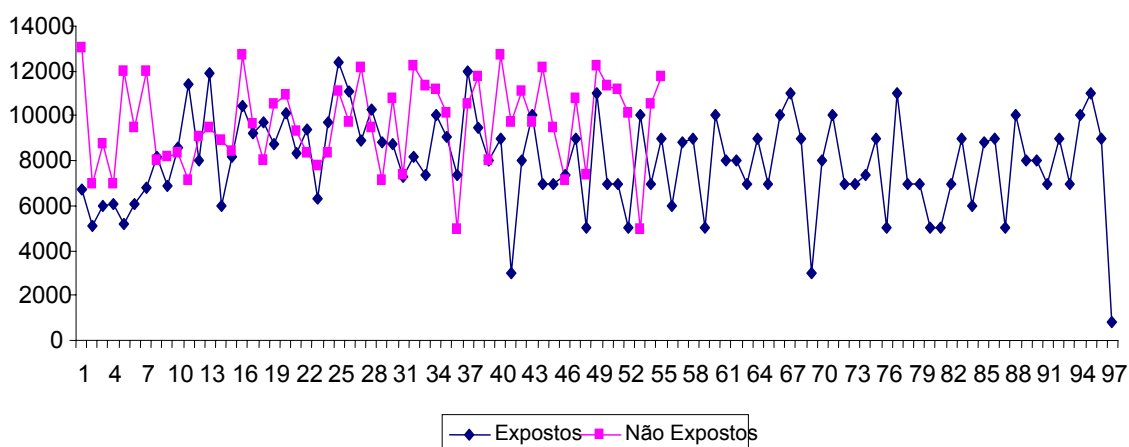


Figura 22. Perfil bioquímico para butirilcolinesterase em trabalhadores expostos e não expostos aos agrotóxicos no Piauí no ano de 2008 a 2010

Segundo Knudsen e Hansen, (2007) a inibição da AChE por compostos organofosforados é bem conhecida, desencadeia um acúmulo endógeno de acetilcolina responsável pela toxicidade do sistema nervoso. Outros estudos comprovam diminuição na BChE e ALA-D em indivíduos expostos aos agrotóxicos (REMOR *et al.*, 2008).

A BChE tem sido mundialmente usada para monitorar a exposição aos agrotóxicos organofosforados e carbamatos com grandes associações e reduções em populações expostas. Assim, inibe a acetilcolinesterase e está conectado com o aumento de riscos para o desenvolvimento de linfomas e de câncer de pulmão (SINGH *et al.*, 2007; ALI *et al.*, 2008). A atividade da AChE é correlacionada com o aumento de danos em linfócitos avaliados com o teste cometa (ZELJEZIC *et al.*, 2007). Uma forma comum de deficiência adquirida de colinesterase, incluindo tanto a colinesterase verdadeira quanto a pseudocolinesterase, consiste na exposição excessiva a organofosfatos (SILVA, 2001).

A determinação da colinesterase verdadeira é mais valiosa em caso de suspeita de exposição excessiva prolongada, visto que as concentrações eritrocitárias levam mais tempo para diminuir do que as concentrações séricas de pseudocolinesterase, e também necessitam de mais tempo para normalização após a exposição. Os indivíduos cujo trabalho esteja associado à exposição crônica a essas substâncias químicas são freqüentemente monitorizados por determinações freqüentes das concentrações de colinesterase. Outras causas potenciais incluem hepatopatias crônicas, desnutrição e hipoalbuminemia (PAGANA; PAGANA, 2001).

No presente estudo foram encontradas alterações significantes para as transaminases (TGO e TGP) $p < 0,01$ e $p < 0,001$ respectivamente (**Tabela 12**). Sendo a transaminase TGO menos específica para se afirmar que existe uma doença hepática já que também se encontra no músculo cardíaco, nos ossos, rins, cérebro, pâncreas, pulmões, leucócitos e eritrócitos. A TGP, em geral, é mais específica do fígado. Entre os fatores que contribuem para o aumento das transaminases estão o abuso de bebidas contendo álcool, a exposição a sangue contendo vírus (usuários de drogas, tatuagens, transfusões) a provável existência de doença biliar, o uso atual de medicamentos hepatotóxicos, imunossupressão, hepatopatia prévia, enfermidade cardíaca (DOLES, 2008). Segundo Ramos (2009) o aumento de TGO é considerado forte indicativo de lesões crônicas, enquanto o aumento de TGP sugere lesões agudas, podendo 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. Estudo realizado por Khan (2006) estudando o efeito do chá preto

em animais expostos a agrotóxicos observou claramente, que esses animais apresentavam extenso dano hepático, e altos níveis de TGO e TGP, demonstrando dessa forma a agressão hepática dos agrotóxicos.

O uso do glifosato pelos trabalhadores foi de 46,6%, o que pode ter contribuído para o aumento da TGO, pois segundo Hernández *et al.*(2006) esta enzima pode ser alterada em exposições a agrotóxicos dentre eles o glifosato, resultando em uma sutil disfunção hepática que poderá futuramente culminar em citotoxicidade.

5.3 Avaliação Genotóxica com o Teste do Cometa em Mucosa Bucal

O biomonitoramento de populações humanas expostas aos agentes potencialmente mutagênicos e carcinogênicos pode providenciar informações iniciais de desregulações celulares e iniciação do desenvolvimento de câncer. Nos recentes anos o teste cometa, conhecido como eletroforese em gel de agarose tem sido importante biomarcador para avaliar danos em populações expostas ambientalmente ou ocupacionalmente, a poluentes do ar, metais, agrotóxicos, radiações e outros xenobióticos (VALVERDE; ROJAS, 2009).

A avaliação da genotoxicidade em agricultores do Piauí expostos aos agrotóxicos foi realizada com o teste cometa em células de mucosa bucal e em linfócitos de sangue periférico. A exposição aos agrotóxicos nos municípios estudados sugere possíveis danos ao DNA de agricultores. Os parâmetros genotóxicos, Índice de Dano (ID), Frequência de Danos (FD), foram comparados com o grupo exposto e obtivemos significância em nível de $p < 0,001$ relacionados às medias do grupo não exposto na avaliação de células de mucosa bucal (**Tabela 13**). Segundo Tice (2000), os danos observados são possíveis da ação de maquinarias de reparo a depender da extensão do dano.

Tabela 13. Avaliação genotóxica em células esfoliadas de mucosa bucal de agricultores expostos aos agrotóxicos em Municípios do Piauí, ano 2008 a 2010.

Grupos	Índice de danos ao DNA (0 - 400)	Frequências de danos ao DNA (%)
Expostos N = 97	45,85 ± 3,10*** (11 – 188)	29,41 ± 1,58*** (8 – 82)
Não expostos N = 55	12,51 ± 1,02 (2 – 48)	9,98 ± 0,63 (2 – 20)

Resultados expressos em Média ± Erro padrão. Intervalo mínimo e máximo 100 células por indivíduo, totalizando 15.200 células. Significância em *** $p < 0,001$, em relação aos trabalhadores não expostos analisado com o teste t de Student.

Foi observada a presença de danos ao DNA nas classes 2, 3 e 4 e a maior frequência de danos na classe 1, assim como na classe 0. Os danos ao DNA encontrados em nossa pesquisa (**Figura 23**) variaram nos escores de 0-4 com diferenças significantes entre os grupos em todas as classes de danos. Esses achados reforçam a idéia de que os agrotóxicos são potentes substâncias causadoras de lesão ao DNA.

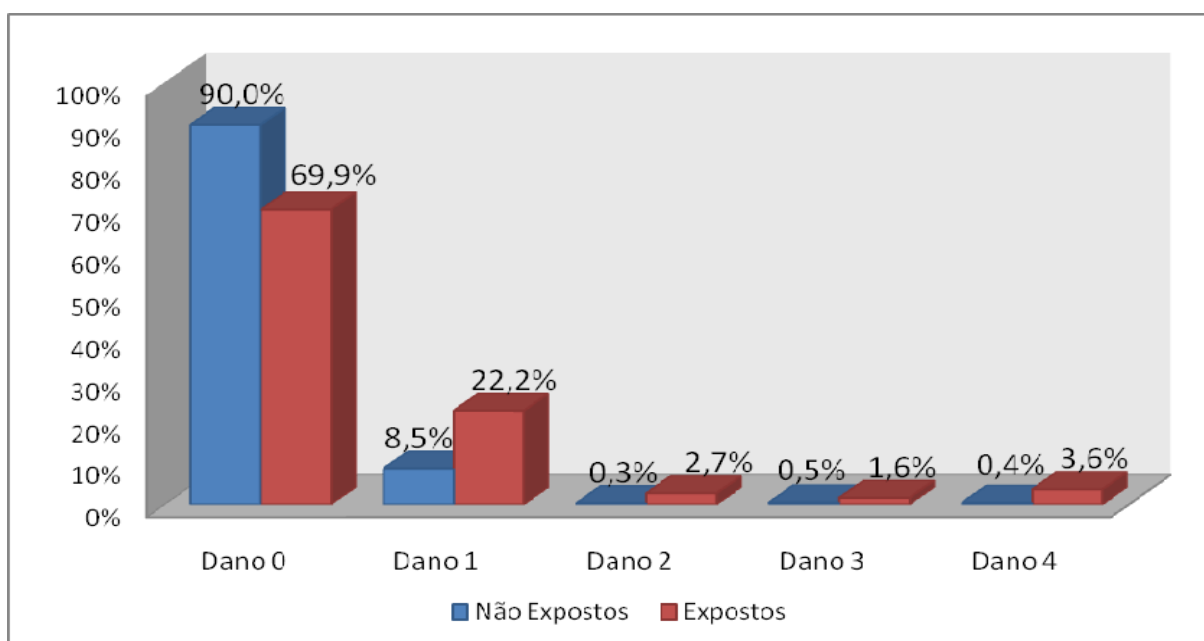


Figura 23. Genotoxicidade em células esfoliadas de mucosa bucal em agricultores do Piauí (2008 a 2010) observado pelas classes de danos (0-4). Significância em $p < 0,001$, em relação aos trabalhadores expostos (n=97) comparados com os não expostos (n=55) analisado pelo teste t.

O perfil eletroforético de cometas em células de mucosa bucal em trabalhadores expostos aos agrotóxicos no Estado do Piauí está apresentado na **Figura 24**.

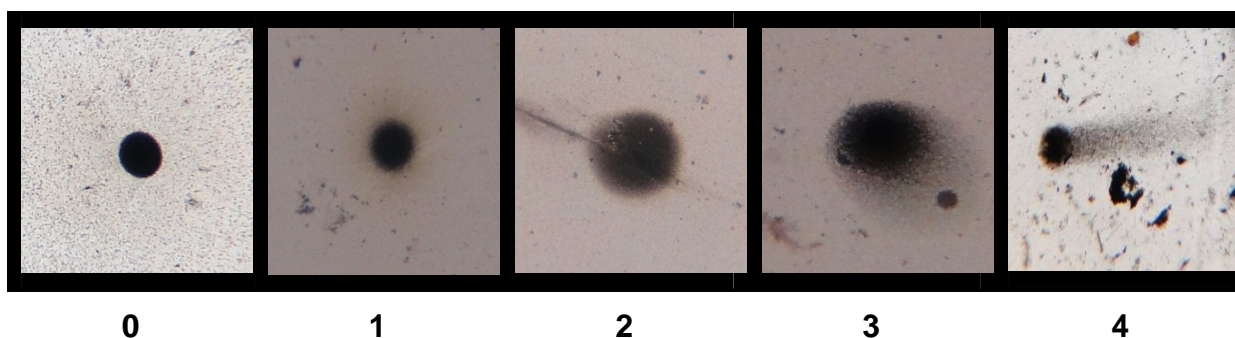


Figura 24. Perfil eletroforético característicos para as classes de danos observadas por microscopia óptica num aumento de 400x em trabalhadores expostos aos agrotóxicos no Estado do Piauí, ano de 2008 a 2010.

5.4 Avaliação Genotóxica com o Teste do Cometa em Linfócitos

O teste cometa *in vivo* é bastante usado na avaliação genotóxica com várias aplicabilidades em vários tecidos e com muita sensibilidade para detectar baixos níveis de danos ao DNA com pequenos números de células nas amostras biológicas (BRENDLER-SCHWAAB *et al.*, 2005). Na versão alcalina pode detectar diferentes tipos de danos ao DNA em células eucarióticas tratadas *in vivo* ou *in vitro* com agentes genotóxicos com aplicações para o monitoramento humano e seus resultados podem ser correlacionados com os de outros biomarcadores de danos ao DNA (ALBERTINI *et al.*, 2000). O teste cometa tem aplicações na área biomédica, saúde ambiental e biomonitoramento humano a agentes tóxicos, avaliando danos ao DNA e estresse oxidativo (DUSINSKA; COLLINS, 2008).

De forma similar, aos danos observados com as células esfoliadas de epitélio bucal de agricultores expostos aos agrotóxicos (**Tabela 13**), foram corroborados com os efeitos da exposição aos agrotóxicos no ID e na FD ao DNA em linfócitos apresentados na **Tabela 14**. A fotomicrografia apresentada na **Figura 25** demonstra claramente às classes de danos observadas em agricultores expostos aos agrotóxicos no Piauí. Outros autores também demonstraram os efeitos

genotóxicos aos agrotóxicos com a aplicação do teste do cometa (VIGREUX *et al.*, 1998; ZELJEZIC; GARAJ-VRHOVAC, 2001).

Tabela 14. Avaliação genotóxica em linfócitos de agricultores expostos aos agrotóxicos em municípios do Piauí, ano 2008 a 2010.

Grupos	Índice de danos (0 - 400)	Frequências de danos (%)
Expostos N=97	33,27 ± 2,01 *** (7 - 110)	21,44 ± 0,84*** (6 - 50)
Não expostos N=55	10,12 ± 0,55 (2 - 20)	9,38 ± 0,48 (2 - 18)

Média ± erro padrão. Intervalo mínimo e máximo 100 células por indivíduo, totalizando 15.200 células. Significância em *** $p < 0,001$, em relação aos trabalhadores não expostos analisado com o teste t.

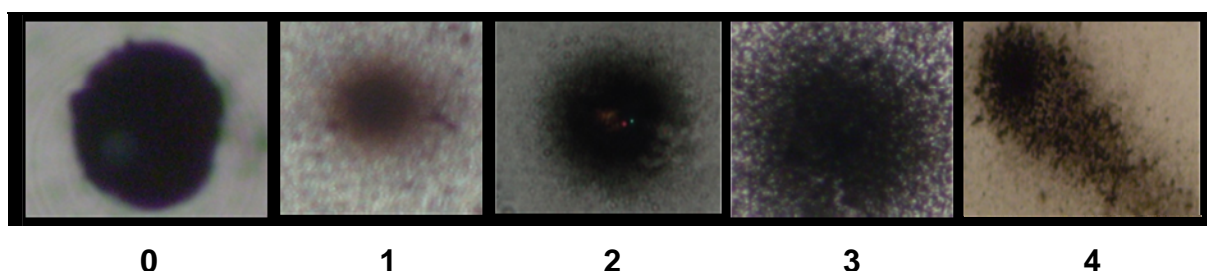


Figura 25. Fotomicrografia das classes de danos em linfócitos de trabalhadores expostos aos agrotóxicos no Estado do Piauí, ano 2008 a 2010.

Os danos observados no presente estudo podem ser provavelmente, relacionados às quebras simples e duplas, formação de adutos ao DNA e pontes intra e inter cadeias (FAIRBAIRN *et al.*, 1995), possíveis de serem detectados na versão alcalina do teste do cometa. Apesar de alguns danos ao DNA serem reparados, é necessário o permanente biomonitoramento de genotoxicidade a várias misturas de agrotóxicos, com o uso de biomarcadores de genotoxicidade, para a prevenção de futuras lesões no DNA, as quais podem induzir crescimentos neoplásicos em células somáticas danificadas. Nos últimos anos o monitoramento dos efeitos genotóxicos de químicos em humanos com o objetivo de avaliar os riscos

tem aumentado e como resultado tem sido identificado marcadores da exposição humana a mutágenos e carcinógenos (VALVERDE; ROJAS, 2009).

O teste de cometa tem sido usado para determinar danos de DNA em linfócitos em trabalhadores expostos a uma variedade de agrotóxicos (MUNIZ *et al.*, 2008; DA SILVA *et al.*, 2009). Estudos *in vitro* indicam genotoxicidade em linfócitos de trabalhadores expostos ao 2,4 D (GONZALES *et al.*, 2005) e *in vivo* para o agrotóxicos monocrotophos, endossulfan, dimetoato (JAMIL *et al.*, 2004). Entretanto interações sinérgicas podem ser esperadas como descritas por Karabay e Oguz (2005). Cabe ressaltar que esses agrotóxicos foram usados em misturas complexas pelos agricultores do Piauí.

Os resultados deste estudo indicam que a exposição a uma mistura de agrotóxicos, induz um aumento significativo do nível de danos no DNA em cultura de linfócitos (**Tabela 14**). Exposição ocupacional a misturas de agrotóxicos tem sido muito bem associada com o aumento de danos genotóxicos e exposição de baixas doses de misturas complexas de agrotóxicos induz efeitos citogenéticos cumulativos. Entretanto, cabe enfatizar que os danos genotóxicos também podem ser influenciados por variantes de polimorfismos de genes envolvidos nos metabolismos de compostos químicos e em mecanismos de reparo do DNA (BOLOGNESI, 2003).

O teste cometa é conhecido como um teste sensível e rápido para detecção de danos ao DNA, como também para avaliar a capacidade de reparo. Danos em linfócitos de sangue periférico foram evidenciados em agricultores expostos aos agrotóxicos, quando comparados com o grupo controle, entretanto após 6 meses das análises foram evidenciados um decréscimo no ID e na FD, indicado atividades de reparo nos danos ocasionados aos linfócitos. Esses indicaram que a exposição ocupacional ao atrazino, alaclor, cianazina, 2.4. diclorofenoxacético e malation é capaz de causar um significativo aumento nos níveis de danos ao DNA, o que pode levar simultaneamente o aumento de alterações cromatídicas e cromossômicas (GARAJ-VRHOVAC; ZELJEZIC, 2001).

A oxidação ao DNA é conhecida como o mais comum mecanismo de dano ao DNA humano, especialmente induzido por EROs, que geram os radicais livres e outras formas reativas de oxigênio (peróxido de hidrogênio, anion superóxido, oxigênio *singlet*, radical hidroxil, óxido nítrico e peroxinitritos). As EROs são produzidas nas células durante metabolismo normal envolvendo os processos com oxigênio. São geradas durante respiração celular, processos de biossíntese e biodegradação, biotransformação de xenobióticos e ativação fagocítica. Existem cerca de 60 reações enzimáticas envolvendo o oxigênio como substrato. A presença de EROs pode ser significativamente aumentada pela exposição a diferentes toxinas ambientais produzidas na indústria, agricultura, hábitos de fumar ou poluição accidental (AZQUETA *et al.*, 2009). A exposição ao agrotóxico genotóxico carbofurano induz estresse oxidativo na célula aumentando a produção de ERO e de espécies reativas de nitrogênio (ERN) (MILATOVIC *et al.*, 2005, 2006). Estudos experimentais em animais e em cultura de tecidos mostram que os agrotóxicos, especialmente organofosforados induzem estresse oxidativos (BANERJEE *et al.*, 2001).

A exposição aos agrotóxicos aumenta significativamente ($P < 0,001$) os danos ao DNA em linfócitos, como observado pelas classes de danos (**Figura 26**). Estudos relatam que a exposição a misturas complexas de agrotóxicos induz danos ao DNA em linfócitos de sangue periférico de trabalhadores expostos aos agrotóxicos, observado pelo aumento do ID e FD (REMOR *et al.*, 2008). Estudos de avaliações de riscos em misturas complexas de agrotóxicos são de difíceis entendimentos sobre os químicos que a compõem no sentido da identificação de compostos que tenham efeitos tóxicos e/ou genotóxicos, devido aos efeitos antagônicos e/ou sinérgicos dos compostos presentes na mistura. O conhecimento sobre a influência de químicos em repostas genotóxicas é importante para a aplicabilidade de testes genotóxicos no biomonitoramento (ERGENE *et al.*, 2007).

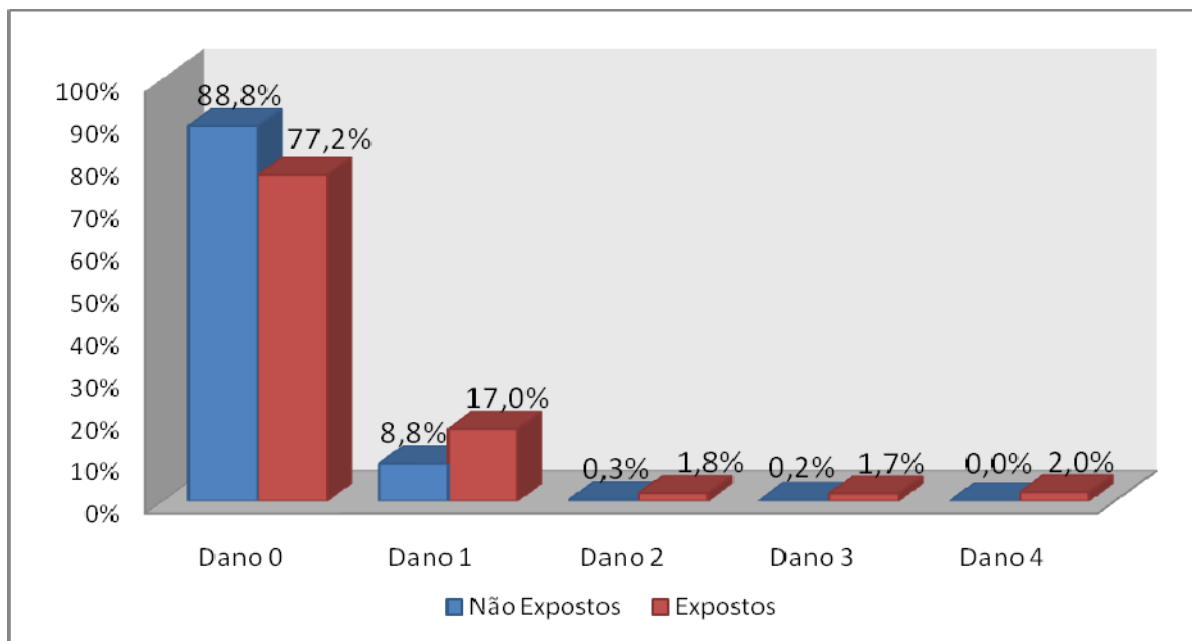


Figura 26. Genotoxicidade em linfócitos de sangue periférico em agricultores do Piauí, observado pelas classes de danos (0 - 4). Significância em $*p < 0,001$, em relação aos trabalhadores não expostos analisado com o teste t.**

A exposição aos agrotóxicos usando o teste cometa em linfócitos mostra resultados positivos entre os danos ao DNA e os níveis de diclodifenol, dicloroetileno (YANEZ *et al.*, 2004; PEREZ-MALDONADO *et al.*, 2006). Entretanto, exposição à deltametrina não induz danos em linfócitos de sangue periférico (ORTIZ-PEREZ *et al.*, 2005).

Danos ao DNA, estresse oxidativo vem sendo proposto como mecanismos resultantes da exposição aos agrotóxicos em vários estudos epidemiológicos (SINGH *et al.*, 2007; MUNIZ *et al.*, 2008), com o uso do teste cometa como biomarcador de genotoxicidade que detecta quebra simples, dupla e reparos incompletos por excisão de nucleotídeo (REMOR *et al.*, 2008). Trabalhadores envolvidos na fabricação de agrotóxicos com > 10 anos de exposição apresentaram o comprimento da cauda do cometa, significativamente aumentado. Os efeitos genotóxicos em trabalhadores expostos a agrotóxicos foram relatados com o aumento da duração da exposição (PADMAVATHI *et al.*, 2000; GROVER, 2003). Da mesma forma, um estudo de possíveis danos genéticos em trabalhadores croatas ocupacionalmente expostos a uma mistura complexa de agrotóxicos

mostraram um aumento nos valores dos parâmetros de ensaio cometa (GARAJ-VRHOVAC; ZELJEZIC, 2001).

Nesta pesquisa foi evidenciado que os resultados encontrados no teste cometa em linfócitos de sangue periférico (**Figura 26**) estão correlacionados ao resultado do teste cometa da mucosa bucal (**Figura 23**). Visto que o teste cometa é um excelente biomarcador para mensurar níveis de danos ao DNA, evidencia-se um efeito genotóxico causado pelos agrotóxicos ao grupo exposto que, tanto na mucosa como em linfócitos do sangue periférico, apresentaram percentual de dano nas várias classes com resultados similares. Dentre os diversos mecanismos de ação dos agrotóxicos sugere-se, como discutido anteriormente, a indução de estresse oxidativos. Os agrotóxicos podem induzir estresse oxidativos via múltiplos caminhos, resultado em desequilíbrio entre os mecanismos pró-oxidantes e antioxidantes em diferentes tecidos, incluindo alterações em enzimas antioxidantes (BANERJEE *et al.*, 2001).

Cabe enfatizar que o teste cometa é um biomarcador de genotoxicidade que indica danos recentes ao DNA, com ações da maquinaria de reparo de DNA (COLLINS, 2008), o que possivelmente indica a não fixação de danos. Entretanto, não foram realizados estudos da capacidade de reparo de danos de DNA em agricultores do Piauí expostos aos agrotóxicos, mas outros biomarcadores de mutagenicidade foram aplicados para a avaliação de instabilidade genética com capacidade para evidenciar a fixação de danos em células de mucosa bucal e em linfócitos de sangue periférico.

5.5 Avaliação Mutagênica com o Teste de Micronúcleo em Mucosa Bucal

O teste de MN em células esfoliadas de epitélio bucal permite concluir que a exposição aos agrotóxicos aumenta significativamente os danos genéticos e isso implica em quebra de cromossomos, alterações no aparato mitótico e outras anormalidades nucleares tais como as CR e CL (GOMEZ-ARROYO *et al.*, 2000). A presença de micronúcleos é um indicativo de agentes clastogênicos e/ou aneugênicos com efeitos durante a divisão celular. Os MN em células epiteliais de mucosa bucal e de epitélio uretral apresentam muitas vantagens em estudos de

biomonitoramento em populações expostas em agentes químicos e/ou físicos suspeitos para genotoxicidade (PASTOR *et al.*, 2002; PASTOR *et al.*, 2003).

Associações entre a frequência de MN e risco de câncer são similares aos mecanismos inferidos para as AC, aos quais são indicativos para prever riscos de câncer (BOFFETTA *et al.*, 2007; NORPPA *et al.*, 2006). Um dos principais mecanismos na formação de MN, a quebra e a perda de cromossomo (**Figura 4**). A quebra tem papel na carcinogênese, entretanto a aneuploidia ainda não está bem estabelecida como mecanismo de carcinogênese. A aneuploidia pode ocorrer devido a centrômeros anormais com mitoses multipolares, perda de cromossomo na anáfase que resulta em defeitos no cinetócoro, má segregação de cromátides que resulta em separação, inibição do índice mitótico, com formação de células tetraplóides e falhas na citocinese por defeitos na organização de microfilamentos o que interfere na replicação nuclear (FENECH, 2002).

Os MN são bons marcadores e indicativos de exposição a agentes clastogênicos e aneugênicos, e em células epiteliais; inúmeras são as vantagens no biomonitoramento de populações humanas, expostas aos compostos potencialmente genotóxicos, a exemplo de misturas complexas de agrotóxicos (PASTOR *et al.*, 2003). O teste de MN em células esfoliadas de mucosa bucal é um método minimamente invasivo, e a frequência de MN é relativamente rara, ou seja, na proporção de 1/1000 (CEPPI *et al.*, 2010) e os mecanismos de sua formação indicam instabilidades cromossômicas (TERRADAS *et al.*, 2010).

No presente estudo, significantes ($p < 0,001$) aumentos na frequência de micronúcleos foram evidenciados nos indivíduos expostos aos agrotóxicos, em relação aos não expostos (**Tabela 15**). Os resultados obtidos mostram que há relação entre a exposição aos agrotóxicos com a indução de MN em células de epitélio bucal. Apesar de existirem poucos estudos realizados, existem dados reportados que indicam resultados negativos (LUCERO *et al.*, 2000; PASTOR *et al.*, 2001) e positivos (GOMEZ-ARROYO *et al.*, 2000; GARAJ-VRHOVAC *et al.*, 2001; COSTA *et al.*, 2007) quanto ao aparecimento desses danos citogenéticos.

Tabela 15. Mutagenicidade avaliada pelo teste MN nos indivíduos expostos e não expostos a misturas complexas de agrotóxicos no Piauí no ano de 2008 a 2010.

Grupos	Micronúcleo/2000 células	Frequência (%) de MN
Expostos (N=97)	4,95 ± 2,81*** (0 - 15) ^b	0,24 ± 0,14*** (0 – 0,75) ^b
Não expostos (N=55)	0,72 ± 1,20 (0 - 6) ^b	0,03 ± 0,06 (0 – 0,30) ^b

2000 células por indivíduo, totalizando 304.000 células avaliadas quanto a presença de MN. Resultados expressos em Média ± desvio padrão. Intervalo mínimo e Máximo ^b. Significância em *** $p < 0,001$, em relação aos trabalhadores não expostos analisado com o teste t.

Os resultados da avaliação mutagênica pelo teste de MN em mucosa bucal (**Figura 27**), onde foram analisadas cerca de 2000 células por indivíduo indicam mutagenicidade. No grupo exposto, o número de MN (4,95 ± 2,81) foi estatisticamente significativo ($p < 0,001$) em relação ao não exposto (0,72 ± 1,20), indicando com aumentos significativos na frequência de micronúcleos do grupo exposto (0,24 ± 0,14), em relação ao grupo não exposto (0,03 ± 0,06). O perfil fotomicrográfico está apresentado na **Figura 28**, mostrando células normais e células com micronúcleos.

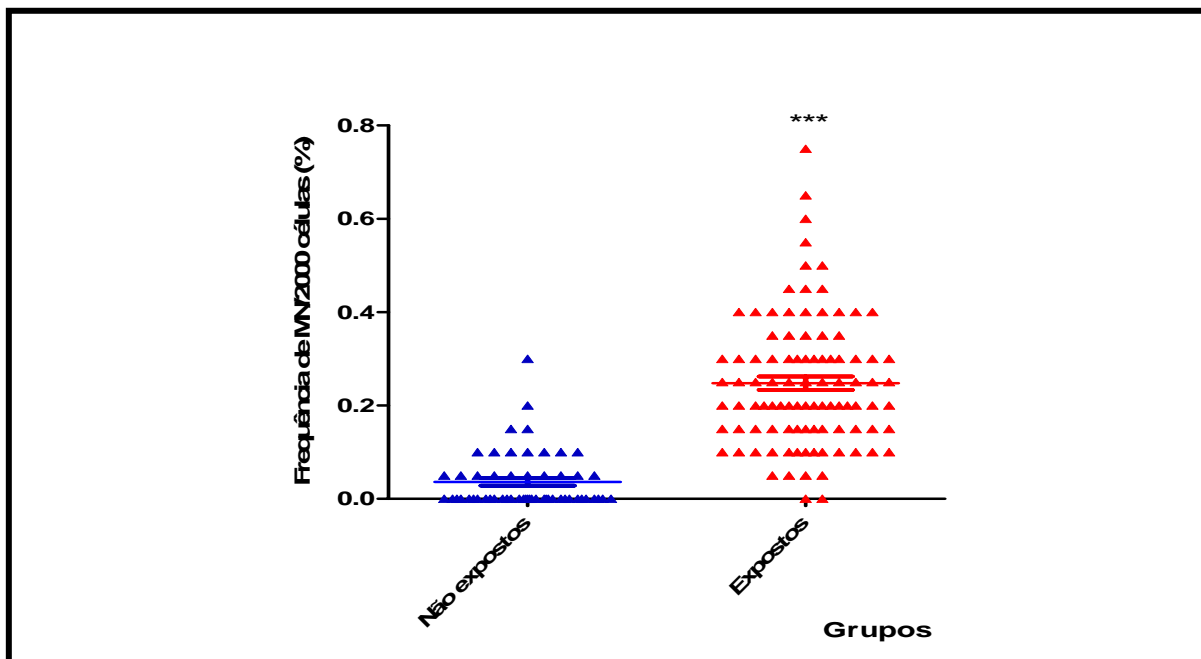


Figura 27. Mutagenicidade, avaliada pela frequência de micronúcleos em mucosa bucal de trabalhadores expostos aos agrotóxicos no Piauí (2008 a 2010). Significância em $***p < 0,001$, em relação aos trabalhadores não expostos analisado com o teste t.

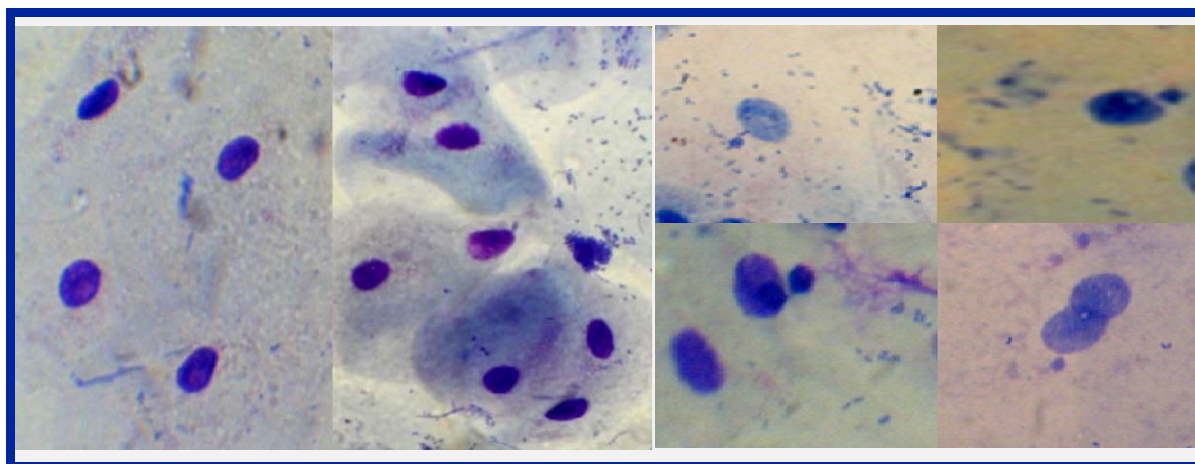


Figura 28. Fotomicrografias de células de epitélio esfoliado de mucosa bucal sem anormalidade, e com micronúcleos, indicativos de mutagenicidade em agricultores expostos aos agrotóxicos, anos 2008 a 2010.

Estes resultados divergem daqueles encontrados por Pastor *et al.* (2003), que analisando micronúcleos em células de mucosa bucal não encontrou aumento significativo de MN em trabalhadores rurais expostos ocupacionalmente aos agrotóxicos. No entanto, nossos resultados assemelham-se com Gómez-Arroyo *et al.* (2000) que encontrou níveis elevados de danos citogenéticos pelo aumento de MN em células bucais em relação ao grupo controle. Sailaja *et al.* (2006) avaliou a frequência de MN em 54 indivíduos que trabalhavam na produção de agrotóxicos e em 54 controles. Nos trabalhadores expostos aos agrotóxicos houve um aumento significativo no aparecimento de MN ($1,24 \pm 0,72$ X $0,32 \pm 0,26$).

Estudos similares em trabalhadores brasileiros expostos aos agrotóxicos, no Rio Grande do Sul, também usando o teste de MN em epitélio bucal corroboram com o presente estudo, pois foi observado um aumento do número de MN no grupo exposto ($3,55 \pm 2,13$) em relação ao grupo não exposto ($1,78 \pm 1,23$), indicando que a mistura complexa de agrotóxicos está associada ao potencial genotóxico dos agrotóxicos usados em plantações de soja, devido a não correlação entre fatores de riscos não ocupacionais, tais como hábito de fumar, consumo de álcool e tempo de exposição (BORTOLI *et al.*, 2009).

Cabe mencionar que os trabalhadores expostos e avaliados no presente estudo usam cerca de treze diferentes substâncias químicas (**Tabela 9**), ou seja, ingredientes ativos classificados na Agência de Proteção Internacional (US), como possíveis carcinógenos para humanos tais como cipermetrina, propanil. Em trabalhos de Bolognesi *et al.* (2004) como agentes genotóxicos os glifosato, endossulfan, monocrotophos, que podem ter contribuído para a mutagenicidade observada em células do epitélio bucal do grupo exposto. Entretanto devido ao fato de que esses ingredientes ativos são usados em misturas complexas de agrotóxicos com diferentes combinações de químicos é impossível determinar o composto químico responsável pela mutagenicidade observada como também relata Bull *et al.* (2006).

Alguns estudos relatam à ausência de danos decorrentes da exposição ocupacional a agrotóxicos (DAVIES *et al.*, 1998; PASTOR *et al.*, 2001, 2002), enquanto outros mostram a indução de efeitos aneugênicos e clastogênicos,

indicado pelo aumento da frequência de MN pela exposição aos agrotóxicos (DA SILVA *et al.*, 1997; GARAJ-VRHOVAC; ZELJEZIC, 2000, 2001; GOMEZ-ARROYO *et al.*, 2000; SHAHAM *et al.*, 2001).

A análise de MN em células esfoliadas de mucosa bucal vem sendo demonstrada como método sensível e minimamente invasivo para monitorar danos genéticos em populações humanas (SAILAJA *et al.*, 2006), como observado nas avaliações feitas em agricultores do Piauí expostos aos agrotóxicos. Entretanto, também se faz necessário para indicar instabilidade genética a avaliação de fixação de danos em outros tipos celulares, a exemplo dos linfócitos de sangue periférico.

5.6 Avaliação Mutagênica com o Teste de Micronúcleos com Bloqueio de Citocinese

Os biomarcadores genéticos são usados em prognósticos de riscos de câncer. Dentre estes, a frequência de MN em linfócitos de sangue periférico usando o teste de MN com bloqueio de citocinese é um dos mais comumente usados, pois avalia a instabilidade cromossomal, disfunções mitóticas e morte celular por necroses e apoptoses (ROOS e KAINA, 2006). Os resultados da avaliação mutagênica, com o teste de MN com bloqueio de citocinese, de agricultores do Piauí expostos aos agrotóxicos revelam que a frequência de linfócitos binucleados, com MN, foi significativamente alta ($p < 0,01$), quando comparado com o grupo não exposto (Tabela 16).

Tabela 16. Mutagenicidade em linfócitos de agricultores expostos no Estado do Piauí (2008 a 2010) avaliados com o teste de micronúcleo com bloqueio de citocinese.

Grupos	BNMN/1000 células	% BNMN/1000 células	IDN/500 células
Expostos N= 97	9,38 ± 1,05** (0-35) ^b	0,95 ± 0,11** (0 -3,5) ^b	1,13 ± 0,06 (0- 2,57) ^b
Não expostos N= 55	5,50 ± 0,84 (0 - 23) ^b	0,55 ± 0,08 (0-2,3) ^b	1,01 ± 0,04 (0- 1,75) ^b

Cerca de 152.000 células binucleadas foram avaliadas quando à frequência de MN. Resultados expressos em Média ± desvio padrão. Intervalo mínimo e máximo ^b Significância em ** $P < 0,01$, em relação aos trabalhadores não expostos analisado com o teste t. Formula para cálculo do IDN= $[M1 + 2(M2) + 3(M3) + 4(M4)]/NT$, segundo Salvadori *et al.* (2003).

A avaliação da frequência de MN usando o teste de MN com bloqueio de citocinese, o teste CBMN é o mais comumente usado em estudos de biomonitoramento humano (BONASSI *et al.*, 2005; MINOZZOA *et al.*, 2010). Como encontrado no presente estudo, Márquez *et al.* (2005) também encontrou aumento da frequência de MN em células binucleadas em agricultores expostos aos agrotóxicos em relação aos não expostos ($36,94 \pm 14,47$ vs $9,93 \pm 6,17$).

O perfil fotomicrográficos de linfócitos, com bloqueio de citocinese está apresentado na **Figura 29**. Muitos pesquisadores mostraram associação positiva entre agrotóxicos e danos citogenéticos, pelo aumento na frequência de BNMN em indivíduos expostos aos agrotóxicos em relação ao grupo controle (GÓMEZ-ARROYO *et al.*, 2000; MÁRQUEZ *et al.*, 2005).

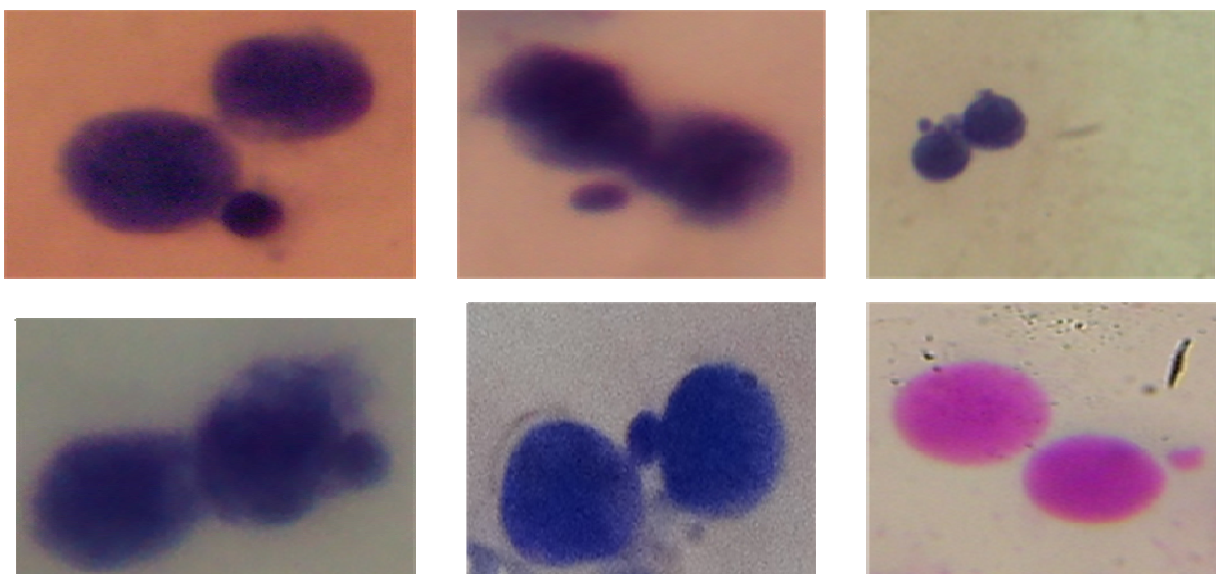


Figura 29. Fotomicrografias mostrando a presença de micronúcleos em linfócitos binucleados, com bloqueio de citocinese indicando mutagenicidade em indivíduos expostos aos agrotóxicos no Piauí (2008 a 2010).

Danos citogenéticos em indivíduos expostos ocupacionalmente aos agrotóxicos foram observados pelo aumento significativo de MN em células binucleadas em linfócitos (**Tabela 16**) como em micronúcleo em mucosa bucal. De forma contrária, Lucero *et al.* (2000), em avaliação a exposição a misturas complexas de agrotóxicos não encontrou resultados significantes para presença de MN em linfócitos de sangue periférico e células da mucosa bucal de trabalhadores expostos aos agrotóxicos.

De acordo com Norppa (2004) o polimorfismo em enzimas de metabolização pode influenciar nos níveis basais de danos cromossômicos. Esta influência contribui para o aumento de aparecimentos dos MN. Entretanto, algumas variantes de genótipos podem ser relatadas como correlacionadas a não significância na frequência de MN resultantes da exposição aos xenobióticos.

Existem relatos da não associação entre genes GSTT1 e GSTM1 com o aumento de danos citogenéticos (AU *et al.*, 1999; BOLOGNESI, 2003). Variações individuais na capacidade de metabolização de xenobióticos podem resultar em diferenças na susceptibilidade aos danos nas células de indivíduos expostos aos agrotóxicos devido às alterações nos genes GSTT1, GSTM1, GSTP1, CYP1A1, CYP2E1 e PON sem diferenças significantes entre fumantes e não fumantes e uso de EPIs (DA SILVA *et al.*, 2008).

As paraoxonases (PONs) são responsáveis pelo metabolismo de inseticidas compostos por organofosfatados (NORPPA *et al.*, 2004). As GST são famílias de enzimas com polimorfismo genético presentes em populações humanas têm sido sugeridos como envolvidas na detoxificação de muitos químicos, incluindo os agrotóxicos (HODGSON *et al.*, 1991). Indivíduos com genótipos nulos para os genes GSTT1 e GSTM1 tem sido associados com o aumento dos riscos de vários cânceres (LEAR *et al.*, 1996).

Os agrotóxicos constituem uma classe de químicos com potencial mutagênico revelados em vários experimentos, que podem induzir mutações, alterações cromossômicas e danos ao DNA. Positiva correlação vem sendo associada entre misturas complexas de agrotóxicos e a presença de MN e AC em muitos estudos citogenéticos indicando efeitos dose-dependentes, duração e intensidade da exposição e efeitos cumulativos (BOLOGNESI, 2003). Diante do exposto no presente estudo também foi aplicado o teste de aberrações cromossômicas, como um biomarcador de instabilidade genética, que pode sugerir prognósticos para o desenvolvimento de neoplasias. Evidências científicas também demonstram uma grande associação entre o aumento da frequência de AC com o aparecimento de MN de forma associada com os riscos de câncer, devido ao

potencial dos agentes genotóxicos de poder causar danos ao DNA (HAGMAR *et al.*, 2004).

5.7 Avaliações Mutagênicas em Linfócitos, com o Teste de Aberrações Cromossômicas

As AC representam um excelente marcador, e recentemente vem sendo associadas como indicadoras de câncer, em trabalhadores expostos aos agrotóxicos, particularmente, em pulmão e em trato gastrointestinal (HAGMAR *et al.*, 2004; ROSSNER *et al.*, 2005; NORPPA *et al.*, 2006). Os indivíduos expostos aos agrotóxicos apresentaram significantes ($p < 0,001$) aumentos no percentual de AC, quando comparados com os indivíduos não expostos, indicando que na mistura química de agrotóxicos contém agentes potencialmente mutagênicos.

A frequência de AC nos indivíduos expostos ($3,24 \pm 0,44$) em relação aos não expostos ($0,40 \pm 0,07$) também foi estatisticamente significativa. Os resultados das análises de AC estruturais são mostrados na **Tabela 17**.

Tabela 17. Mutagenicidade em linfócitos de agricultores expostos aos agrotóxicos no Estado do Piauí (2008-2010), avaliada com o teste de aberrações cromossômicas.

GRUPOS	ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS						AC (%)
	DICÊNTRICOS	TRICÊNTRICOS	ANEL	ANEL ACÊNTRICO	DELEÇÃO TERMINAL	DELEÇÃO INTERSTICIAL	
Expostos	1,03 ± 0,12***	0,51 ± 0,09***	1,08 ± 0,12***	0,23 ± 0,06***	0,19 ± 0,06***	0,20 ± 0,05***	3,24 ± 0,44***
N= 97	(0-5) ^b	(0-3) ^b	(0-5) ^b	(0-3) ^b	(0- 3) ^b	(0-2) ^b	(0- 4,33)
Não expostos	0,18 ± 0,05	0,00 ± 0,00	0,43 ± 0,11	0,09 ± 0,03	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,40 ± 0,07
N=55	(0-1) ^b	(0-0) ^b	(0- 4) ^b	(0-1) ^b	(0-0) ^b	(0-0) ^b	(0 – 2,19)

Média ± Erro padrão. Intervalo mínimo e máximo ^b300 células e 100 metáfases para cada indivíduo, totalizando 45.600 células. Significância em ***p< 0,001, em relação aos trabalhadores não expostos, observados com o Teste t Student's.

As AC são particularmente perigosas para a célula porque a descontinuidade física do cromossomo pode causar perda de informação genética, e até mesmo morte celular (CARBONELL *et al.*, 1995). Apesar da significância observada em linfócitos de sangue para o percentual de AC em indivíduos expostos em relação aos não expostos, os dados obtidos são diferentes em relação a outros estudos realizados em trabalhadores expostos aos agrotóxicos. Sailaja *et al.*, (2006) avaliou a frequência de AC e o número de AC, indicando dano cromossômico quando comparado ao grupo controle ($8,43 \pm 2,36$ X $3,32 \pm 1,26$, $p < 0,05$). Estudos mostram que após 8 anos de exposição às misturas complexas de agrotóxicos aumenta significativamente o número de células com aberrações cromatídicas e cromossômica dos tipos: quebras, fragmentos acêntricos, dicêntricos em agricultores expostos ($6,9 \pm 1,59$), em comparação com o grupo controle ($1,02 \pm 0,77$), sugerindo que a mistura tem efeitos clastogênicos (ZELJEZIC; GARAJ-VIRHOVAC, 2001). Entretanto, em estudos realizados por Costa *et al.* (2007) não foram encontradas frequências significantes para AC em agricultores portugueses expostos aos agrotóxicos, mas a frequência de MN e de quebras de cromátides irmãs foram significativamente aumentadas em relação a agricultores não expostos aos agrotóxicos.

Os tipos de AC mais encontradas no grupo exposto foram cromossomos dicêntricos ($1,03 \pm 0,12$), anel ($1,08 \pm 0,12$), tricêntricos ($0,51 \pm 0,09$), anel acêntrico ($0,23 \pm 0,06$), deleções terminais ($0,19 \pm 0,06$) e intersticiais ($0,20 \pm 0,05$). Os tipos de AC podem ser resultados de lesões não reparadas, como também derivadas de células precursoras da medula óssea, como sugerido por Carrano e Natarrajan (1988). A **Figura 30** mostra claramente os diferentes tipos de AC identificadas em indivíduos expostos aos agrotóxicos no Piauí e a **Figura 31**, mostra as AC evidenciadas no presente estudo, tais como: anéis, anéis acêntricos, cromossomos dicêntricos e tricêntricos. Nossos resultados foram similares aos encontradas por Zeljezic e Garaj-Virhovac (2001).

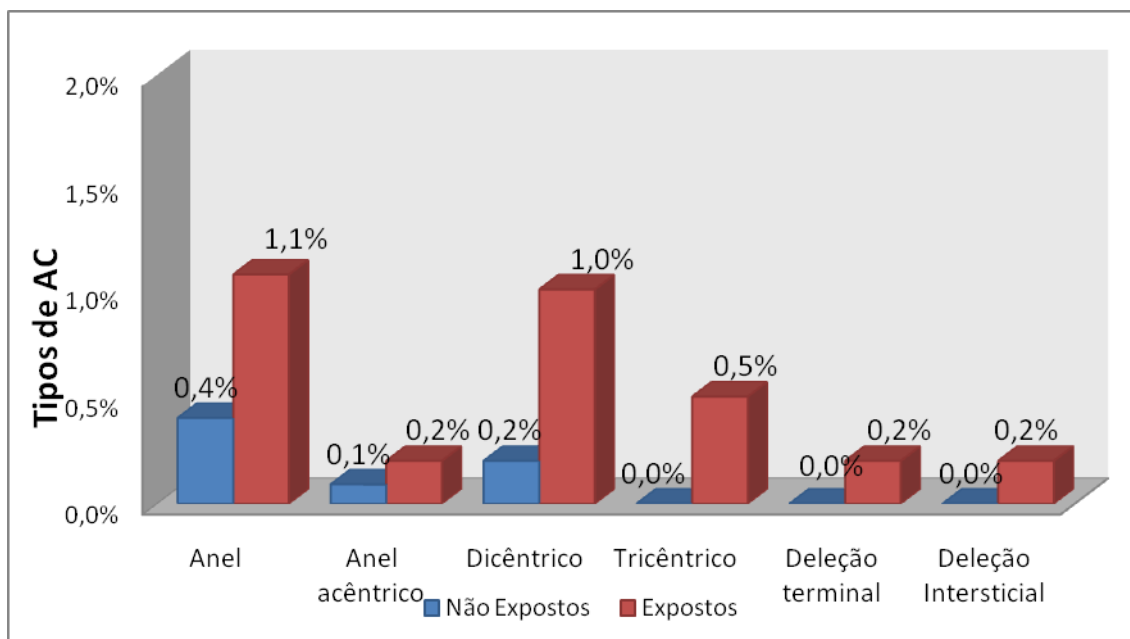


Figura 30. Aberrações cromossômicas estruturais encontradas em agricultores expostos aos agrotóxicos no Piauí (2008 a 2010), identificadas pelo percentual de AC calculados em 100 metáfase identificadas em 300 células. Significância em $p < 0,001$, em relação aos trabalhadores não expostos.

Estudos com trabalhadores expostos aos agrotóxicos, xenobióticos, usados na agricultura exibem altas frequências de AC que são alteradas e/ou modificadas pelos relevantes polimorfismos de genes envolvidos em detoxificações, defesas antioxidantes, a exemplo dos genes GSTT1, NBS1, XME e EPHX1 e em enzimas envolvidas no reparo de DNA (MUSAK *et al.*, 2008). Existem relatos de o aumento de AC em trabalhadores expostos aos agrotóxicos, em relação a trabalhadores não expostos está associado com polimorfismos dos genes GATT1 e XME e para enzimas envolvidas em reparo de DNA (MUSAK *et al.*, 2008).

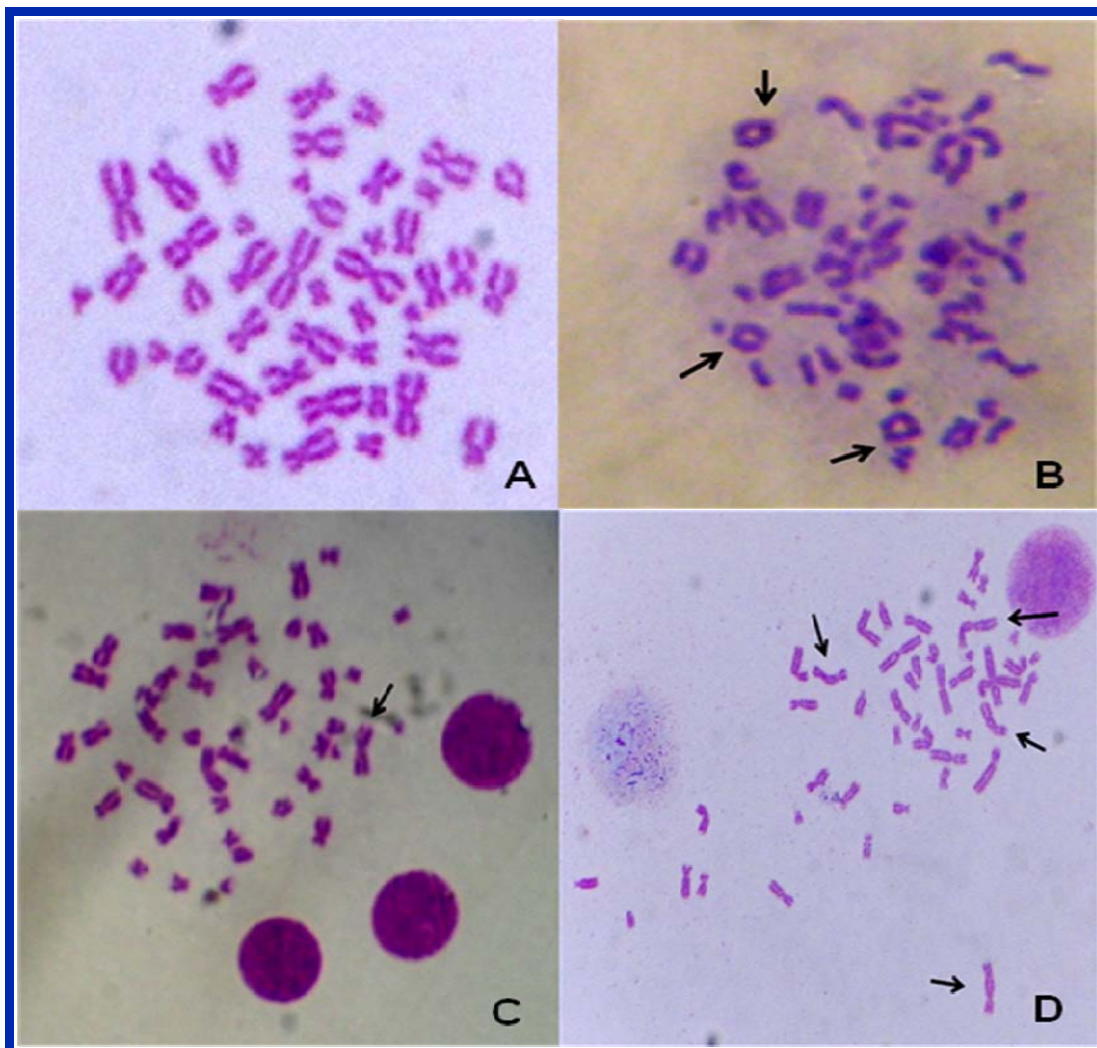


Figura 31. Fotomicrografias dos cromossomos normais e das AC identificadas em trabalhadores expostos a misturas complexas de agrotóxicos, ano 2008 a 2010. Em (A) observa-se cromossomos estruturalmente normais; (B) vários cromossomos formando anéis acêntricos; (C) aberração cromatídica do tipo quebra; (D) cromossomos dicêntricos e tricêntricos.

Danos citogenéticos em floriculturistas expostos aos agrotóxicos foram avaliados nos testes de quebras de cromátides irmãs em linfócitos de sangue periférico e MN em células esfoliadas de mucosa bucal. Os agrotóxicos têm sido considerados como químicos potencialmente mutagênicos (GOMEZ-ARROYO *et al.*, 2000).

Estudos prévios têm sugerido que a frequência de AC e quebras de cromátides irmãs são prognósticos de câncer, pois o alto número de AC é associado com o aumento de riscos de câncer, a exemplo de cânceres do trato gastrointestinal,

assim o uso do teste de AC se constitui como um excelente biomarcador de riscos ocupacionais, em avaliações prévias de instabilidades genéticas, de forma preventiva (NORPPA *et al.*, 2006).

Muitas teorias que estão envolvidas nos mecanismos das AC ressaltam conceitos de que clastogênicos agem diretamente sobre o DNA e causam quebras e empareamento incorreto, com fixação de alterações nos cromossomos que são visíveis em metáfases. Cabe enfatizar que as quebras vistas em metáfases e anáfases não são originadas diretamente de quebras induzidas por agentes clastogênicos, mas derivam de quebras geradas por enzimas envolvidas em reparo de DNA. As quebras são criadas: (1) durante o enovelamento normal do DNA (topoisomerases) durante replicação do DNA, (2) quebras associadas com reparo que ocorrem antes da replicação; (3) enzimas envolvidas no desenovelamento do DNA, participam da síntese e reparo, mas não se ligam covalentemente ao DNA (BIGNOLD, 2009).

5.8 Avaliações de Anormalidades Nucleares em Células Esfoliadas de Mucosa Bucal e em Linfócitos.

Os dados de anormalidades nucleares evidenciadas com o teste de MN em epitélio de mucosa bucal, tais como cariólise (CL) e células binucleadas, estão apresentados na **Tabela 18**, indicando que danos ao DNA de células de mucosa bucal de agricultores do Piauí expostos aos agrotóxicos podem ter levado a apoptose, devido provavelmente a falta de reparo ou a reparo incompleto e ineficiente. Esses corroboram com os encontrados por Ergene *et al.* (2007) em agricultores expostos aos agrotóxicos, onde as frequências de células com brotos, cariorrexe (CR), CL e células binucleadas foram estatisticamente aumentadas em relação aos agricultores não expostos.

Tabela 18. Anormalidades nucleares indicativas de apoptose e citotoxicidade, avaliadas pelo teste MN em células de mucosa bucal em agricultores piauienses expostos a agrotóxicos no ano de 2008 a 2010.

Grupos	Cariólise/2000 Células	Frequência de Cariólise (%)	Binucleadas/2000 Células	Frequência de binucleadas (%)
Expostos	113 ± 89,7*** (6-478) ^b	5,65 ± 4,51*** (0,01- 23,90) ^b	41,67 ± 36,7*** (4,4 – 205) ^b	2,13 ± 1,96*** (0,20 – 10,25) ^b
Não expostos	41,9 ± 23,9 (2- 200) ^b	2,21 ± 2,60 (0,10 – 15) ^b	10,22 ± 6,01 (0,30 – 24) ^b	0,49 ± 0,31 (0 – 1,2) ^b

2000 células por indivíduo, totalizando 304.000 células. Média ± Desvio padrão. Intervalo mínimo e máximo ^b. Significância em *** $p < 0,001$ em relação aos trabalhadores não expostos analisado com o teste t.

Os micronúcleos são marcadores da exposição humana a genotóxicos e tem sido extensivamente usado para identificar agentes genotóxicos. Os micronúcleos são indicadores de instabilidade cromossomal e sua alta frequência ocorre em células tumorais e em células com defeitos em reparo de DNA os disrupção do checkpoint no ciclo celular. Recentemente evidências acumuladas sugerem indução de parada no ciclo celular ocasionando a indução de apoptose (TERRADAS *et al.*, 2010).

A indução de danos ao DNA pode seguir a uma proeminente rota de inativação celular, apoptose. Algumas lesões ao DNA tais como as induzidas pela 6-metilguanina, alquilações das bases, aductos ao DNA, crosslinks e quebras de fita dupla pode levar a apoptose, devido ao não reparo ou ao reparo incorreto. A apoptose induzida por muitos químicos é uma consequência do bloqueio de replicação do DNA, o qual leva ao colapso da forquilha de replicação e formação de quebras DSBs. As DSBs são detectadas pelas proteínas ATM (ataxia telangiectasia – mutações) e ATR (ataxia telangiectasia e RAD3), as quais demonstram sinais para CHK1, CHK2 (Kinases, checkpoint) e p53. A proteína p53 induz ativação transcricional de fatores pró-apoptóticos tais como FAZ, PUMA a BAK. Outro desencadeador é a inibição da síntese de RNA, o qual leva a um declínio nos níveis

críticos dos produtos dos genes MKP1 (ativador de proteínas quinases fosforiladas) ocasionando a ativação de JUK (Jun kinase) o que estimula os receptores da apoptose. A resposta de dano ao DNA na sinalização da apoptose depende do tipo de célula e do status das proteínas p63 e p73 e mais importante da capacidade de reparo DNA, ponto importante nas intervenções terapêuticas (WYNAND; BERND, 2006).

No nosso estudo a **Tabela 18** indica o número e a frequência de anormalidades nucleares (CL $5,65 \pm 4,51$ X $2,21 \pm 2,60$) dos grupos expostos e não expostos, onde se observou significantes aumentos ($p < 0,001$). Um indicativo de citotoxicidade, podendo levar a apoptose, avaliado pelo teste de MN para células binucleadas esfoliadas da mucosa bucal é mostrado na **Tabela 18**, onde indivíduos expostos apresentaram um aumento significativo ($p < 0,001$) na frequência dessas células ($2,13 \pm 1,96$) em relação aos não expostos ($0,49 \pm 0,31$). A **Figura 32** apresenta claramente as frequências de CL e de células binucleadas em agricultores do Piauí expostos aos agrotóxicos (2008 a 2010).

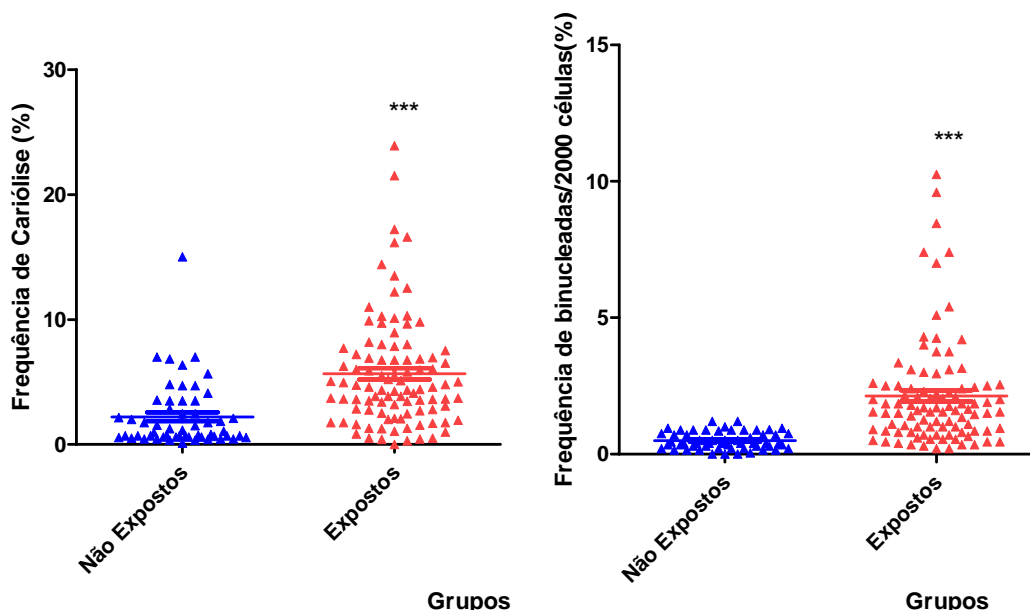


Figura 32 Indicativo de apoptose, pelas frequências de cariólise e de binucleadas em células de mucosa bucal de agricultores expostos aos agrotóxicos no Piauí (2008 a 2010). Significância em *** $p < 0,001$ em relação aos trabalhadores não expostos analisado com o teste t.

O aumento da frequência de anomalias por CL ocorre em processos de pré-queratinização, o qual representa uma resposta adaptativa às injúrias celulares, especialmente em células necróticas e relacionadas à citotoxicidade, provavelmente

devido a constantes agentes mutagênicos, a exemplo do álcool e do tabaco (TOLBERT *et al.*, 1991). As CR e células binucleadas são estágios prévios de CL e de MN, respectivamente, em epitélio escamoso. Essas formações metanucleadas são degenerações nucleares que levam aos estágios de clastogênese – mutagênese carcinogênese. O índice de reparo (IR) pode ser representado por $IR = (\text{média de cariólise} + \text{média de cariorrexe}) / (\text{média de micronúcleos} + \text{média de células binucleadas})$ e pode refletir carcinogênese. A frequência de CL aumenta com a idade e em pacientes com câncer. De fato a produção de CL e CR pode representar processos de reparo, que ocorrem antes dos danos citogenéticos, como indicado pelas células binucleadas e MN. Uma avaliação diferente para processos de carcinogênese, em câncer oral baseado em anomalias metanucleadas foi proposta por Bhattathiri (2001).

O número de anormalidades nucleares, como fragmentação (CR) e dissolução (CL) nuclear indicativos de apoptose foram elevados no grupo teste, o que pode significar uma aceleração do processo de morte celular e uma possível desregulação nos genes envolvidos no processo. O perfil de células de mucosa esfoliadas do epitélio bucal de com anormalidades nucleares está apresentados na **Figura 33**.

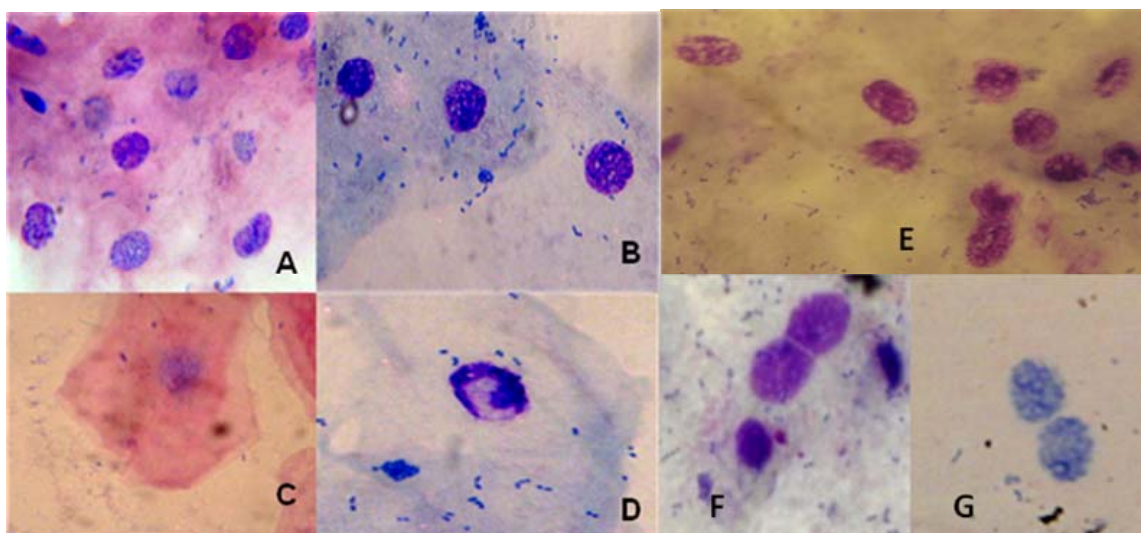


Figura 33. Apoptose evidenciada em células de esfoliadas de mucosa bucal de agricultores do Piauí expostos aos agrotóxicos (2008 a 2010), identificadas por cariorrexe, cariólises e células binucleadas. A, B e E mostram células em cariorrexe (fragmentação nuclear); C e D mostram células em cariólise(dissolução nuclear) e F e G, células binucleadas

O aparecimento de células binucleadas no grupo exposto foi estatisticamente significativa em relação ao não exposto. As células binucleadas são indicativas de citotoxicidade decorrentes numa falha no processo de citocinese (HOLLAND *et al.* 2008) e pode prever uma falha no mecanismo de diferenciação celular ou ser secundária à agentes genotóxicos. Os processos subjacentes ao aparecimento dessas anormalidades não são ainda totalmente compreendidos. Porém, existe um grande número de publicações que se referem a esses critérios (OZKUL *et al.*, 1997; BURGAZ *et al.*, 1999; CELIK *et al.*, 2003; BASU *et al.*, 2002; REVAZOVA *et al.*, 2001; GONSEBATT *et al.*, 1997; CARVALHO *et al.*, 2002).

No presente estudo também foi possível evidenciar indicativos de apoptose e de necrose com o teste de MN com bloqueio de citocinese, corroborando com os dados mencionados anteriormente (**Figura 32**). Dados significantes foram observados para apoptose e necroses em 1000 células (linfócitos) de trabalhadores expostos aos agrotóxicos em relação ao grupo não exposto (**Tabela 19 e Figura 34 e 35**).

Tabela 19. Apoptose e necrose em linfócitos de agricultores piauienses expostos aos agrotóxicos (2008-2010), avaliadas com o teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese

Grupos	Apoptose	Necrose	IDNC (%)
Expostos N= 97	258 ± 23,33*** (9 – 504) ^b	130, 3 ± 14,46*** (12 - 483) ^b	0,75 ± 0,298*** (0,40 – 1,78) ^b
Não expostos N= 55	49,31 ± 6,16*** (0 – 167) ^b	21, 45 ± 16,56*** (0 - 53) ^b	0,42 ± 0,19 (0,34 ± 0,57) ^b

1000 células viáveis por indivíduo, totalizando 60.800 células. Média ± Desvio padrão. Intervalo mínimo e Maximo ^b. Significância em *** $p < 0,001$ em relação aos trabalhadores não expostos analisado com o teste t. Formula para cálculo do IDNC= [apoptose +necrose + M1+2(M2) + 3(M3) + 4(M4)]/NT segundo Salvadori *et al.* (2003).

O método descrito para inclusão de análise de células apoptóticas e necróticas, que é convencionalmente usado é o de MN com bloqueio de citocinese. Os agentes químicos e físicos podem ou não induzir ou inibir necrose e apoptose, a indução de necrose pode resultar na ação intracelular de enzimas degradativas de partículas sub celulares tais como os lisossomos, o qual possa durante diferentes

estágios da necrose realizar a digestão do DNA. A inibição da apoptose nas células resulta no significativo nível de danos ao DNA no ciclo celular com a sobrevivência de células mutadas, isso sugere que a apoptose tem um importante papel na eliminação de células com danos em DNA. Recentemente muitos testes de genotoxicidade vêm ignorando o papel das necroses e apoptoses nos biomarcadores citogenéticos (FENECH *et al.*, 1999a).

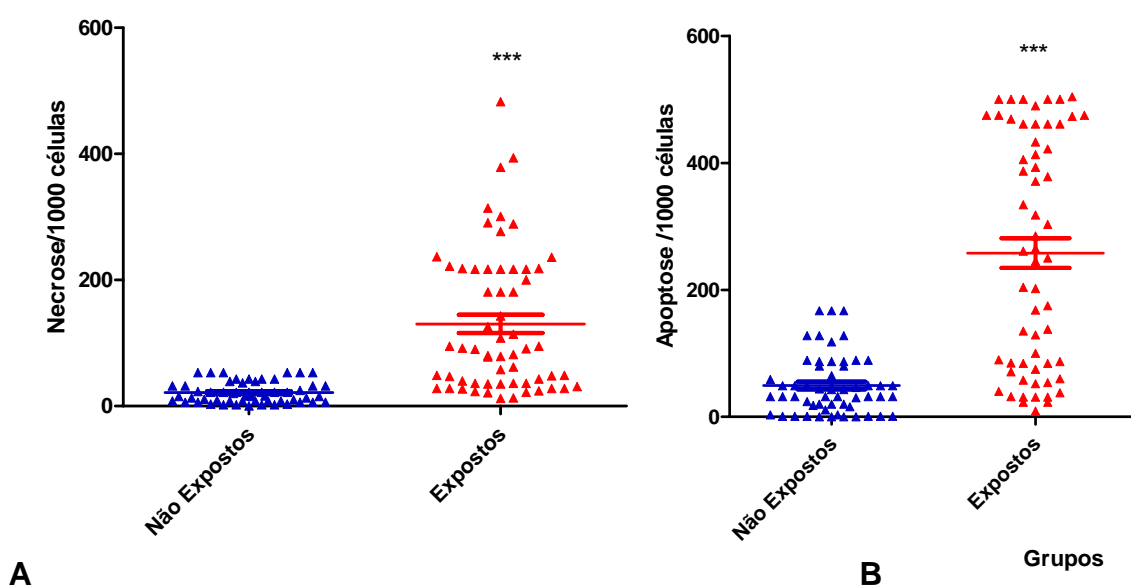


Figura 34. Necroses (A) e apoptoses (B) evidenciadas em linfócitos de sangue periférico de agricultores do Piauí expostos aos agrotóxicos (2008 a 2010), identificadas com o teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese. Significância em $***p < 0,001$ em relação aos trabalhadores não expostos analisado com o teste t.

Os testes citogenéticos requerem divisão celular especialmente os testes em cultura assim as células não totalmente danificadas são observadas em processos de apoptose ou necrose, dessa forma na avaliação da genotoxicidade em estudos populacionais é importante considerar não somente danos em DNA, mas também os efeitos necróticos e apoptóticos (FENECH *et al.*, 1999a).

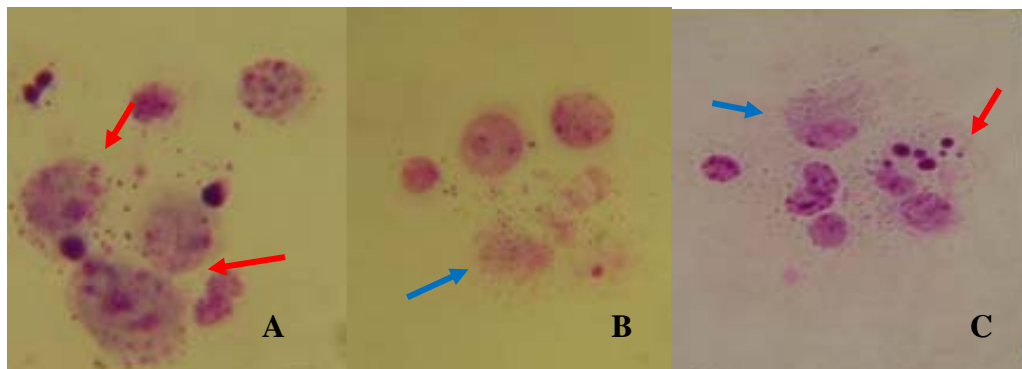


Figura 35. Apoptose (A – seta vermelha) e Necrose (B – seta azul), Necrose e apoptose (C) evidenciadas em linfócitos de sangue periférico de agricultores do Piauí expostos aos agrotóxicos (2008 a 2010), identificadas com o teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese. Significância em *** $p < 0,001$ em relação aos trabalhadores não expostos analisado com o teste t.

5.9 Influências de Fatores de Riscos não Ocupacionais e Ocupacionais na Avaliação da Genotoxicidade e Mutagenicidade em Agricultores expostos aos Agrotóxicos no Piauí, ano de 2008 a 2010.

Correlação positiva foi evidenciada entre a idade, tabagismo e etilismo em relação ao ID e FD no epitélio de mucosa bucal avaliado pelo teste cometa, mesmo com o percentual de 33% de fumantes e 59,8% de consumo de álcool para os expostos provavelmente, devido a alta sensibilidade do teste e ao fato da mucosa ser uma via mais rápida para a absorção de químicos, conforme mostrado na **Tabela 20**. O tabagismo e etilismo podem interferir nas análises como fatores de confusão (GROVER *et al.*, 2003).

Tabela 20 Correlações positivas entre os fatores de risco ocupacionais e não ocupacionais e genotoxicidade, mutagenicidade em trabalhadores do Piauí expostos a agrotóxicos, com o teste de cometa, micronúcleo e aberração cromossômica no ano 2008 a 2010.

TESTES	COMETA (MB)	COMETA (LINF)	MN / MB	MN/ LINF.	AC	CARIOLISE (MB)	CEL. BINUCL EADAS (MB)	NECROSE (CBMN)	APOPTOSE
FATORES NÃO OCUPACIONAIS									
Idade	r=0,31 (ID) r=0,28 (FD) p<0,01	---	---	---	---	r=0,43 p<0,01	r=0,55 p<0,01	---	---
Tabagismo	r=0,23 (ID) r=0,20 (FD) P<0,05	---	---	---	---	---	---	---	---
Etilismo	r=0,36 (ID) r=0,37 (FD) p<0,01	---	---	r=0,45 p<0,01	r=0,02 p<0,05	---	---	---	r=0,33 p<0,01
Micronutriente < Consumo	---	---	---	r=0,27 p<0,05	---	---	---	---	---
FATORES OCUPACIONAIS									
Tempo trabalho	r=0,23 p<0,05	---	---	---	---				
Carga Horária	---	---	---	---	---				
Uso de EPI	---	---	---	r=0,32 p<0,01	---				

Coeficiente de correlações não paramétricas de Spearman.(r); *Significante para p < 0,05.

Está bem estabelecido que com o aumento da idade aumente o risco de aneuploidia e não disjunção mitótica e mudanças nos cromossomos, bem como o aumento de mutações, devido ao acúmulo de danos não reparados, provavelmente pela redução na capacidade de reparo (MIGLIORE *et al.*, 1991). Entretanto, outros

estudos não têm mostrado essas correlações. Estas diferentes respostas podem estar relacionadas ao tamanho das amostras analisadas, além da variabilidade e da susceptibilidade individual das populações em estudo. Segundo Betti *et al.* 1994, as correlações de danos citogenéticos com estes fatores ficam extremamente difíceis de serem conclusivos, especialmente quando se tem um número pequeno de indivíduos.

Não foram evidenciadas correlações dos fatores de riscos não ocupacionais tais como idade, tabagismo, etilismo e o baixo consumo de micronutrientes com a mutagenicidade evidenciada com o teste de MN, em células esfoliadas de mucosa bucal, entretanto, correlação positiva significativa foi identificada com os MN em linfócitos binucleados em relação ao etilismo e ao baixo consumo de micronutrientes, como também com as AC foi evidenciada correlação positiva com o etilismo (**Tabela 20**). Nossos resultados também foram similares aos encontrados por Lucero *et al.* (2000) e Pastor *et al.* (2001), onde não houve associação entre as frequências de MN e o fumo. Aumento na frequência de MN também não foi relacionado com a ingestão de álcool (GOMEZ-ARROYO *et al.*, 2000). Resultados semelhantes foram observados por Salajja *et al.* (2006), onde fatores de confundimento como idade, sexo, tabagismo e consumo de álcool não influenciaram no aumento da frequência de MN e AC.

Existem relatos de análise de variância indicando que a exposição ocupacional a agrotóxicos tem efeitos na frequência de MN em células da mucosa bucal ($p < 0,05$), entretanto, na análise comparativa à idade, fumantes e consumo de bebidas não foram evidenciadas correlações significantes ($p > 0,05$) com os danos citogenéticos em células somáticas (CELIK; KANIK, 2006). Entretanto, vários estudos epidemiológicos mostram que o hábito de fumar induz danos ao DNA, com relatos de câncer nos pulmões, pois o cigarro é um carcinógeno amplamente testado em roedores e em humanos (AMES, 1983). Em alguns estudos, o tabagismo não contribuiu significativamente para o aumento do número de AC (ZELJEZIC; GARAJ-VRHOVAC, 2001).

A influência do hábito de fumar em danos citogenéticos foi evidenciada no aumento de AC e de quebras em fumantes de grupo exposto a mutágenos, provavelmente devido ao grande número de substâncias genotóxicas no cigarro, mas não foram evidenciadas alterações na frequência de MN, explicada possivelmente pelos danos a órgãos tais como o pulmão, com efeitos insuficientes em células sanguíneas (BONASSI *et al.*, 2005).

Em relação às anormalidades nucleares em células de mucosa bucal de agricultores expostos aos agrotóxicos no Piauí foram observadas correlações apenas com a idade, mas não foram encontradas correlações para tabagismo, etilismo e micronutrientes. Em linfócitos de sangue periférico foi evidenciada correlação positiva entre etilismo e apoptose (**Tabela 20**).

Nesse estudo onde apenas metade da população em análise usa EPIs (**Tabela 8**) não foram observadas correlações como aumento da frequência de MN em células de mucosa bucal (**Tabela 20**), mas não invalida a necessidade de programa educacional, implantação de medidas para o uso de proteção individual, considerando os resultados obtidos para mutagenicidade com o teste de MN. Entretanto, correlação significativa ($p < 0,01$) com $r = 0,32$, da frequência de MN em linfócitos binucleados foi evidenciada com EPIs, assim como correlação significativa ($p < 0,05$) foi observado entre o tempo de trabalho e o ID e FD no teste de cometa em mucosa bucal (**Tabela 20**).

O uso de EPIs é altamente importante para a prevenção da genotoxicidade induzida pelos agrotóxicos (BULL *et al.*, 2006). O maior caminho de absorção dos agrotóxicos é a pele e o sistema respiratório (FARIA *et al.*, 2007) por essa razão o uso apropriado de máscaras e de casacos é necessário para prevenir a contaminação. Os riscos genéticos em trabalhadores expostos aos agrotóxicos têm sido associados com o uso de EPIs. Em estudos de revisão Bull *et al.* (2006) relatam que em trabalhadores onde mais de 60% usam equipamentos de proteção, todos os resultados foram negativos para mutagenicidade, entretanto, em outros estudos o uso de EPI's não determina claramente as diferenças em respostas aos agentes genotóxicos. Bolognesi, (2002) encontrou uma elevação na frequência de MN em indivíduos expostos a agrotóxicos que não usavam equipamentos de

proteção durante a jornada de trabalho. Um aspecto que chamou atenção neste estudo foi o fato de que 50,5% dos indivíduos do grupo exposto usavam EPIs durante a aplicação dos agrotóxicos (**Tabela 8**). Esse dado foi observado também durante as visitas nos locais de trabalho, assim, são preocupantes os riscos ocupacionais do não uso de EPIs, em quase metade da população em estudo. O uso de equipamentos de proteção revela ser uma importante forma de prevenção na exposição ocupacional e diminui os danos genéticos induzidos pelos agrotóxicos (COSTA *et al.*, 2007). O Ambiente de trabalho com uso de EPI e o tempo e condições de exposição são descritos na literatura como fatores capazes de afetar os níveis de dano citogenético (BOLOGNESI, 2003).

Os resultados encontrados nesse trabalho utilizando os testes do micronúcleo, cometa e aberrações cromossômicas fornecem informações claras que os indivíduos pesquisados apresentam riscos de instabilidade genética associados aos agrotóxicos, e que esta evidência salienta a necessidade de programas educacionais para a agricultura piauiense a fim de reduzir o uso de produtos químicos associados ao uso completo e correto dos equipamentos de proteção individual. Os testes realizados têm sido utilizados como biomarcadores nas investigações em que ocorrem exposições a agentes genotóxicos, em particular aos agrotóxicos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

É crescente a preocupação sobre o efeito mutagênico e carcinogênico de agentes genotóxicos em populações expostas ocupacionalmente, acidentalmente ou por estilo de vida. Conforme os dados mais recentes levantados pela OMS o câncer será a primeira causa de mortalidade no mundo nas próximas décadas. Associado a este fato, o câncer possui um forte impacto na sociedade, debilitando indivíduos produtivos, tanto no âmbito social quanto no econômico, além de constituir sério problema de saúde pública.

A exposição aos agrotóxicos em nosso ambiente pode causar uma variedade de efeitos sobre a saúde humana. Alguns deles se expressam imediatamente, enquanto outros levam anos para se manifestarem. Efeitos tardios bem conhecidos incluem a indução do câncer, doenças genéticas nas gerações seguintes, entre outros. Esforços contínuos da Secretaria de Saúde do Piauí, por meio da Diretoria de Unidade de Vigilância Sanitária Estadual- DIVISA/ Centro de Referência Estadual em Saúde do Trabalhador-CEREST e Laboratório Central do Estado do Piauí -LACEN têm sido feitos para identificar os agentes perigosos, reconhecer as condições de exposição danosa e monitorar populações que podem estar expostas excessivamente, com o objetivo de prevenir conseqüências adversas à população.

Os agricultores piauienses vêm sendo expostos a uma infinidade de genotóxicos pela ingestão de alimentos e bebidas, pela inalação de fumaças, agrotóxicos e irradiações diversas no meio ambiente. Agentes mutagênicos podem interferir alterando diretamente a estrutura do DNA, ou pela interação com as enzimas que estão envolvidas, direta ou indiretamente com o metabolismo do ciclo celular. As mutações podem ser definidas como alterações de bases nucleotídicas do DNA que, quando são replicadas e transmitidas à descendência das células, tornam-se permanentes. Essas alterações podem ser induzidas por agentes mutagênicos externos, mas também ocorrem espontaneamente, em cada célula ao longo da vida de um organismo, como um processo natural de evolução, que também está fortemente ligado a carcinogênese.

Em pesquisas anteriores, os trabalhadores rurais (lavradores, técnicos agrícolas e operadores de máquinas) do Piauí expostos aos agrotóxicos nos municípios de Ribeiro Gonçalves, Baixa Grande do Ribeiro e Uruçuí envolvidos em agricultura direcionada à produção sazonal de arroz, feijão, milho, mandioca e soja, em contato direto com defensivos agrícolas a base de organofosforados, carbamatos, herbicidas e fungicidas, durante o preparo da mistura de agrotóxicos, aplicação por pulverização, limpeza e manutenção dos equipamentos apresentaram riscos de instabilidade genética, observada pelo aumento da frequência de micronúcleos em células esfoliadas do epitélio bucal. Também foram diagnosticados efeitos muscarínicos (sudorese, náuseas, vômitos, salivação), nicotínicos (dispnéia, palpitação, taquicardia, fraqueza muscular e parestesia) e neuronais.

De forma similar aos municípios supracitados, as avaliações bioquímica, hematológica e de riscos de instabilidade genética de agricultores dos municípios de Picos, Piri-piri, Barras e José de Freitas sugerem para o biomonitoramento ocupacional de trabalhadores expostos aos agrotóxicos no Piauí, devido às considerações destacadas no presente estudo:

- (1)** A população de agricultores dos municípios monitorados no presente estudo possuem média de idade de 40 anos, está há 19 anos trabalhando na lavoura, com o uso de misturas complexas de agrotóxicos;
- (2)** Em relação aos fatores de riscos não ocupacionais mais da metade dos agricultores relataram ter hábito de consumir bebidas alcoólicas (59,8%);
- (3)** Em relação ao consumo de micronutrientes a população biomonitorada indicou o baixo consumo de vegetais(32%).
- (4)** Mais da metade da população afirmaram sobre o uso de EPIs.
- (5)** A maioria dos agricultores biomonitorados relatou sobre o uso de herbicida (53,5%), seguido dos neonicotinóides (17,1%); organofosforados (13%), piretroídes (7,3%)
- (6)** Os agricultores expostos aos agrotóxicos apresentaram alterações hematológicas, na série vermelha diminuição de 10% nos valores do hematócrito, enquanto na série branca 39,18%, tiveram sua contagem

global de leucócitos diminuídos em relação aos trabalhadores não expostos quando comparados aos valores de referências ;

- (7)** Em relação aos parâmetros bioquímicos, alterações para creatinina, TGO, TGP e fosfatase alcalina foram observadas nos indivíduos expostos, no grupo exposto aos agrotóxicos, as alterações da BChE foram observadas para os não expostos, isto é valores acima dos de referência. Somente alguns indivíduos expostos apresentaram inibição no percentual de cerca de 4%, valor não significativo.
- (8)** Genotoxicidade em células esfoliadas do epitélio (mucosa) bucal e em linfócitos de sangue periférico foi indicada pelos significantes ($p < 0,001$) aumentos dos índices e das frequências de danos ao DNA, em agricultores expostos aos agrotóxicos, em relação aos trabalhadores não expostos, com a aplicação do teste cometa. Esses dados sugerem riscos de instabilidade genética. Um dos possíveis mecanismos relatados para a ação dos herbicidas, carbamatos e organofosforados sobre o DNA diz respeito sobre a geração de radicais livres. Entretanto, os danos observados com o teste cometa podem ser alterados devido aos inúmeros mecanismos de reparo, ou podem ocasionar o aparecimento de apoptose;
- (9)** A ação mutagênica dos agrotóxicos em agricultores piauienses foi observada pelo aumento significativo ($p < 0,001$) da frequência de MN em células esfoliadas de mucosa bucal, em comparação com o grupo não exposto aos agrotóxicos. Essa conclusão aponta para efeitos clastogênicos e/ou aneugênicos dos agrotóxicos, que podem ocasionar instabilidade genética;
- (10)** A mutagenicidade da exposição aos agrotóxicos de agricultores piauienses, também foi evidenciada pelo significativo ($p < 0,01$) aumento da frequência de micronúcleos em linfócitos binucleados. Cabe enfatizar os relatos de que o teste de MN, com bloqueio de citocinese é o mais usado em prognósticos de riscos de câncer;
- (11)** A mutagenicidade indicada no testes de micronúcleos em células esfoliadas de mucosa bucal e em linfócitos de sangue periférico foi corroborada com os dados obtidos no teste de aberrações cromossômicas, em linfócitos de sangue periférico, pelo aumento da

frequência de AC em agricultores expostos aos agrotóxicos, em relação ao grupo controle. De forma similar, aos testes de MN e de AC sugerem os efeitos clastogênicos e/ou aneugênicos dos agrotóxicos para instabilidade genética;

- (12)** Possíveis deficiências na capacidade de reparo na população biomonitorada podem ser sugeridas, devido aos aumentos significantes ($p < 0,001$) de anormalidades nucleares indicativas de apoptose, tais como as cariólises em células de mucosa bucal, bem como pelas células binucleadas. De forma similar, também foram evidenciadas significantes ($p < 0,001$) apoptoses em linfócitos de sangue periférico, com aplicação do teste de micronúcleo com bloqueio de citocinese;
- (13)** A exposição aos agrotóxicos dos agricultores dos municípios monitorados também induzem necroses em linfócitos de sangue periférico, como avaliado com o teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese.
- (14)** Não foram encontradas correlações entre os parâmetros bioquímicos e hematológicos com os biomarcadores de genotoxicidade e de mutagenicidade;
- (15)** Significantes ($p < 0,01$) correlações positivas foram evidenciadas para os fatores de riscos não ocupacionais tais como idade, tabagismo e etilismo em relação à genotoxicidade observada pela frequência e índice de danos ao DNA de células esfoliadas do epitélio bucal de agricultores expostos aos agrotóxicos. Entretanto, não foram encontradas correlações desses fatores em linfócitos de sangue periférico;
- (16)** Na avaliação da mutagenicidade pelo teste de MN em mucosa bucal, não foi encontrada correlação com os fatores não ocupacionais. No entanto, em relação ao CBMN foram encontradas correlações positivas com etilismo e com o não consumo de micronutrientes, e correlação positiva também foi encontrada com etilismo e aberração cromossômica.
- (17)** As anormalidades nucleares indicativas de apoptose e células binucleadas, avaliadas com o teste de micronúcleos foram positivamente correlacionadas com a idade em agricultores expostos aos agrotóxicos. De forma similar, em relação ao etilismo também foram demonstradas correlações com anormalidades nucleares indicativas de apoptose;
- (18)** Apesar de mais da metade dos agricultores relatarem o uso de EPIs não foram encontradas correlações entre os parâmetros bioquímicos, hematológicos e biomarcadores de genotoxicidade e de mutagenicidade

e uso de EPIs, exceto, para a frequência de micronúcleos em linfócitos binucleados.

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

Os trabalhadores rurais do Piauí apresentam riscos de toxicidade e de instabilidade genética associados à exposição ocupacional de misturas complexas de agrotóxicos.

RECOMENDAÇÕES

8. RECOMENDAÇÕES

Diante das considerações expostas, os testes para o biomonitoramento de danos ao material genético são de importância para avaliação de efeitos crônicos de agentes genotóxicos/ mutagênicos, que não são detectados em exames de rotina comumente usados para avaliação clínica. Portanto, devem ser implementados para uma maior segurança sobre os possíveis danos genéticos, como uma forma de prevenção para futuras doenças relacionadas à instabilidade do material genético, a exemplo das neoplasias malignas, que normalmente acontecem após anos de exposição aos agentes mutagênicos e carcinogênicos.

Destes resultados de genotoxicidade pode-se deduzir que os trabalhadores estão sujeitos um risco real dos efeitos resultantes da genotoxicidade/mutagenicidade, um dos quais é o câncer, pois existe correlação entre mutações cromossômicas e câncer. O uso de biomarcadores bioquímicos, enzimáticos, citogenéticos e de polimorfismos de genes envolvidos no reparo e nas defesas antioxidantes também são essenciais para o biomonitoramento de risco ocupacional.

Nestes aspectos, a exposição ocupacional ocupa um papel importante e de extrema preocupação por parte de ações de saúde pública, que minimizem a instabilidade genética, como prevenção para as neoplasias. A exposição repetida do ser humano às misturas químicas variáveis e complexas favorece a mutações em consequência a danos de DNA, sendo este um estágio inicial para a formação do tumor. Os resultados obtidos com as análises de parâmetros hematológicos, bioquímicos e genotóxicos/mutagênicos apontam para a necessidade do permanente biomonitoramento de populações do Piauí expostas aos agrotóxicos.

O referido biomonitoramento é de suma importância e deve ser incluído em políticas de saúde pública. Danos citogenéticos e moleculares em indivíduos expostos ocupacionalmente a agentes mutagênicos e genotóxicos vem recebendo atenção em vários países, devido aos riscos de instabilidade genética relacionados à exposição prolongada, o que pode ocasionar doenças degenerativas, incluindo o

câncer. Os dados subsidiam para a projeção da melhoria na qualidade de vida de todos os indivíduos que atuam em atividades agrícolas com o uso de agrotóxicos no Piauí, destacando o uso de EPI's, palestras educativas e o planejamento financeiro, a fim de viabilizar meios científicos de investigação para a proteção e promoção da saúde individual e coletiva dos trabalhadores.

As conclusões geradas através deste trabalho são altamente relevantes para a gênese de políticas locais e nacionais voltadas para a saúde do trabalhador rural. Têm-se então, um documento, cujos dados podem e devem ser utilizados pelo poder público como meio de intervenção e de transformação de uma realidade social, voltada, preferencialmente, para o bem do trabalhador rural piauiense. Assim, urge a necessidade de estudos de biomonitoramento dos riscos ocupacionais de agricultores do Piauí expostos aos agrotóxicos em outros municípios, como de relevância para a prevenção de intoxicações, bem como do aparecimento de instabilidade genética.

Desta forma, o presente trabalho propõe a ser uma etapa importante na preparação da estratégia temática da utilização sustentável dos agrotóxicos no Piauí, através de medidas de vigilância em saúde dos utilizadores e, nomeadamente, dos grupos de riscos, como as pessoas que trabalham no setor agrícola levando a uma escolha mais racional dos agrotóxicos e suas alternativas, visando estabelecer prognóstico em relação ao desenvolvimento de câncer a fim de fornecer aos serviços de vigilância à saúde, subsídios para a implantação de medidas de proteção a estes trabalhadores. Dessa forma reforça-se a necessidade de:

- (1)** Realização do biomonitoramento, pelo menos semestralmente para indivíduos que estão em riscos de instabilidade genética, especialmente com o uso dos testes de micronúcleos em mucosa bucal e cometa em linfócitos de sangue periférico, devido suas eficácias, sensibilidades e baixos custos financeiros;
- (2)** Realização de capacitação de profissionais da Estratégia Saúde da Família para a prevenção e análise de situações de riscos de instabilidade genética;

- (3)** Desenvolvimento de mecanismos internos de avaliação institucional, para diagnóstico de necessidades e prioridades de atendimento as populações expostas aos agrotóxicos.
- (4)** Regulamentação dos programas de colaborações científicas com instituições de ensino superior e de pesquisas nos níveis locais, regionais, nacionais e internacionais, visando a permanente capacitação técnica, estágios e iniciação científica;
- (5)** Substituir o uso de agrotóxicos pelas culturas alternativas, pois a medida que produtores, consumidores, organizações não governamentais e sociedade tomem consciência de que a produção e produtividade agrícola devem estar atreladas a sustentabilidade ecológica, produzindo alimentos de qualidade, mantendo o ecossistema próximo ao natural, apesar de ainda ser um grande desafio para as próximas gerações.
- (6)** Implementação de políticas de saúde públicas voltadas para prevenção do câncer; com elaboração de programas informativos sobre os riscos dos agentes químicos/físicos, uso de equipamentos de proteção, vigilância da qualidade de nutrientes consumidos e biomonitoramento da saúde ambiental ocupacional;
- (7)** Desenvolvimento de ações relativas à saúde do agricultor em programas integrados à prevenção de instabilidade genética e do câncer.
- (8)** Melhor articulação entre órgãos de governo para apoio técnico e maior rigor pelos órgãos de fiscalização coibindo o uso indevido de agrotóxicos.

REFERÊNCIAS

9 REFERÊNCIAS

ABHILASH, P.C.; SINGH, N. Pesticide use and application: An Indian scenario **Journal of Hazardous Materials**, v. 165, p. 1–12, 2009.

ABRAMSSON-ZETTERBERG, L.; DURLING, L. J.; YANG-WALLENTIN, F.; RYTTER, E.; VESSBY, B. The impact of folate status and folic acid supplementation on the micronucleus frequency in human erythrocytes. **Mutation Research**, v. 603, p. 33–40, 2006.

AGÊNCIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA DO PIAUÍ (ADAPI). **Relatório de Controle de Estoque das Revendas Registradas no Estado**. Teresina, 2010.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Reavaliação Toxicológica do Ingrediente Ativo Endossulfan**. Brasília, 2010. Nota técnica.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos**: Relatório de Atividades de 2009.

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.

ALAVANJA, M.C.; DOSEMECI, M.; SAMANIC, C.; LUBIN, J.; LYNCH, C.F.; KNOTT, C. et al. Pesticides and lung cancer risk in the Agricultural Health Study cohort. **American Journal of Epidemiology**, v. 160, n. 9, p. 876–885, 2004.

ALBERTINI, R.J.; ANDERSON, D. D.; HAGMAR, G.R.; HEMMINKI, L.; MERLO, K. F.; NATARAJAN, A.T.; NORPPA, H.; SHUKER, D.E.G.; TICE, R.; WATERS, M.D.; AITIO, A. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. **Mutation Research**, v. 463, p. 111–172, 2000.

ALBIANO, N. F.; MATOS, E.; UIZICH, R.; BUJÁN, E. C.; LORIA, D.; SOBEL, N.; DULOUT, F. Efectos sobre la salud por uso prolongado de plaguicidas. Estudio clínico-bioquímico. **Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana**, v. 20, n.1, p. 65-72, 1986.

ALI, T.; BHALLI, J. A.; RANA, S. M.; KHAN, Q. M. Cytogenetic damage in female Pakistani agricultural workers exposed to pesticides. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 49, p. 374–380, 2008.

ALMEIDA, C. G.; MARTINS, L. H. B. Enzimas hepáticas e acetilcolinesterase como biomarcadores de efeito dos agrotóxicos utilizados na cultura do *Allium sativum*. **Revista Biociências**, v. 14, n. 2, 2008.

ALMEIDA, P J. **Intoxicação por Agrotóxicos**. [S. l.]: Ed. Andrei, 2002.

ALMEIDA, V.; LEITÃO, A.; REINA, L.; MOUNTANARI, A.; DONNICI, C. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, p. 118-129, 2005.

ALONZO, H. G. A.; CORRÊA, C. L. Agrotóxicos. In: OGA, S. *et al.* **Fundamentos de Toxicologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2008. p. 621-642.

AMARANTE JUNIOR, O. P.; SANTOS, T. C. R.; BRITO, N. M.; RIBEIRO, M. L. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 589-593, 2002.

AMES, B. DNA damage from micronutrient deficiencies is likely to be a major cause of cancer. **Mutation Research**, v. 475, p. 7-20, 2001.

AMES, B.N. Dietary carcinogens and anticarcinogens: oxygen radicals and degenerative diseases. **Science**, v. 221, n. 4617, p. 1256-1264, 1983.

AMORIM, L. C. A. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. **Rev. Bas. Epidemiol.**, v. 6, n. 2, p. 158-170, 2003.

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.

ANDRIOLI, A.I. O Roundup, o câncer e o crime do “colarinho verde”. **Revista Espaço Acadêmico**, n. 51, ago. 2005. Disponível em: <<http://www.espacoacademico.com.br/051/51andrioli.htm>>. Acesso em: 17 fev. 2010.

ARAÚJO, A.J.; LIMA, J.S.; MOREIRA, J.C.; JACOB, S.C.; SOARES, M.O.; MONTEIRO, M.C. M.; AMARAL, A.M.; KUBOTA, A.K.; MEYER, A.; COSENZA, C.A.N.; NEVES, C.; MARKOWITZ, S. Exposição múltipla a agrotóxicos e efeitos à saúde: estudo transversal em amostra de 102 trabalhadores rurais, Nova Friburgo, RJ. **Ciências & Saúde Coletiva**, v. 12, n. 1, p. 115-130, 2007.

ARENDS, M. J.; MORRIS, R. G.; WYLLIE, A. H. Apoptosis: the role of the endonuclease. **The American Journal of Pathology** v. 136, n. 3, p. 593-608, 1990.

AU, W. W.; SIERRA-TORRES, C. H.; CAJAS-SALAZAR, N.; SHIPP, B. K.; LEGATOR, M. S. Cytogenetic effects from exposure to mixed pesticides and the influence from genetic susceptibility. **Environmental Health Perspectives** v. 107, p. 501-515, 1999.

AZQUETA, A.; SHAPOSHNIKOV S.; COLLINS A. DNA oxidation: Investigating its key role in environmental Mutagenesis with the comet assay. **Mutation Research**, v. 674, p. 101-108, 2009.

BANERJEE, B. D.; SETH, V.; AHMED, R. S. Pesticide-induced oxidative stress: perspectives and trends. **Reviews on Environmental Health**, v. 16, p. 1–40, 2001.

BASTAKI, M.; HUEN, K.; MANZANILLO, P.; CHANDE, N.; CHEN, C.; BALMES, J.R.; TAGER, I. B.; HOLLAND, N. Genotype-activity relationship for Mn-superoxide dismutase, glutathione peroxidase 1 and catalase in humans, **Pharmacogenet. Genomics**, v. 16, p. 279–286, 2006.

BASU, A.; MAHATA, J.; ROY, A. K.; SARKAR, J. N.; PODDAR, G.; NANDY, A. K.; SARKAR, P. K.; DUTTA, P. K.; BANERJEE, A.; DAS, M.; RAY, K.; ROYCHAUDHURY, S.; NATARAJAN, A. T.; NILSSON, R.; GIRI, A. K. Enhanced frequency of micronuclei in individuals exposed to arsenic through drinking water in West Bengal, India. **Mutation Research**, v. 516, p. 29–40, 2002.

BATTERSHILL, J. M.; BURNETT, K.; BULL, S. Factors affecting the incidence of genotoxicity biomarkers in peripheral blood lymphocytes: impact on design of biomonitoring studies. **Mutagenesis**, v. 23, n. 6, p. 423–437, 2008.

BEDOR, C.N.G. **Estudo do potencial carcinogênico dos agrotóxicos empregados na fruticultura e sua implicação para a vigilância da saúde**. 2008. Tese (Doutorado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, Recife, 2008.

BEETSTRA, S.; SALISBURY, C.; TURNER, J.; ALTREE, M.; MCKINNON, R.; SUTHERS, G.; FENECH, M. Lymphocytes of BRCA1 and BRCA2 germ-line mutation carriers, with or without breast cancer, are not abnormally sensitive to the chromosome damaging effect of moderate folate deficiency, **Carcinogenesis**, v. 27, p. 517–524, 2006.

BETTI, C.; DAVINI, T.; GIANNESI, L.; LOPRIENO, N.; BARALE, R. *Microgel electrophoresis assay (comet test) and SCE analysis in human lymphocytes from 100 normal subjects*. **Mutation Research**, v. 307, n. 1, p. 323-333, 1994.

BERGER, M. M. Can oxidative damage be treated nutritionally ? **Clinical Nutrition** v. 24, p.172-183, 2004

BHATTATHIRI, V.N. Aminotic cell divisions and tumor growth: na alternative model for cell kinetic compartments in solid tumors. **Oral Oncology**, v. 37, p. 288-295, 2001.

BIGNOLD, L. P. Mechanisms of clastogen-induced chromosomal aberrations: A critical review and description of a model based on failures of tethering of DNA strand ends to strand-breaking enzymes. **Mutation Research**, v. 681, p. 271–298, 2009.

BINKOVA, B.; CHVATALOVA, I.; LNENICKOVA, Z.; MILCOVA, A.; TULUPOVA, E.; FARMER, P. B.; SRAM, R. J. PAH-DNA adducts in environmentally exposed population in relation to metabolic and DNA repair gene polymorphisms. **Mutation Research**, v. 620, p. 49–61, 2007.

BOFFETTA, P.; VAN DER HEL, O.; NORPPA, H.; FABIANOVA, E.; FUCIC, A.; GUNDY, S.; LAZUTKA, J.; CEBULSKA-WASILEWSKA, A.; PUSKAILEROVA, D.; ZNAOR, A.; KELECSENYI, Z.; KURTINAITIS, J.; RACHTAN, J.; FORNI, A.; VERMEULEN, R.; BONASSI, S. Chromosomal aberrations and cancer risk: results of a cohort study from Central Europe. **American Journal of Epidemiology**, v. 165, p. 36–43, 2007.

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

BOLOGNESI, C.; LANDO, C.; FORNI, A.; LANDINI, E.; SCARPATO, R.; MIGLIORE, L.; BONASSI, S. Chromosomal damage and ageing: effect on micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes. **Age and Ageing**, v. 28, p. 393–397, 1999.

BOLOGNESI, E. C. LANDINI, E. PERRONE, P. ROGGIERI, Cytogenetic biomonitoring of a floriculturist population in Italy: micronucleus analysis by fluorescence in situ hybridization (FISH) with an all-chromosome centromeric probe, **Mutation Research**, v. 557, p. 109–117, 2004.

BONASSI, D.; UGOLINI, M.; KIRSCH-VOLDERS, U.; STRÖMBERG, R.; VERMEULEN, J.; TUCKER, D. Human population studies with cytogenetic biomarkers: review of the literature and future prospective. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 45, p. 258–270, 2005.

BONASSI, M. S., NERI, C. LANDO, M. CEPPI, Y. LIN, W.P. CHANG, N. HOLLAND, M. KIRSCH-VOLDERS, E. ZEIGER, M. FENECH, The HUMN collaborative group. Effect of smoking habits on the frequency of micronuclei in human lymphocytes: results from the Human MicroNucleus project, **Mutation Research**, v. 543, p. 155–166, 2003

BONASSI, S.; ZNAOR, A.; CEPPI, M.; LANDO, C.; CHANG, W.P.; HOLLAND, N.; KIRSCH-VOLDERS, M.; ZEIGER, E.; BAN, S.; BARALE, R.; BIGATTI, M.P.; BOLOGNESI, C.; CEBULSKA-WASILEWSKA, A.; FABIANOVA, E.; FUCIC, A.; HAGMAR, L.; JOKSIC, G.; MARTELLI, A.; MIGLIORE, L.; MIRKOVA, E.; SCARFI, M.R.; ZIJNO, A.; NORPPA, H.; FENECH, M. An increased micro-nucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. **Carcinogenesis**, v. 28, p. 625–631, 2007.

BONASSI, S.; BOLOGNESI, C.; ABBONDANDOLO, A.; BARALE, R.; BIGATTI, P.; CAMURRI, L.; DALPRA, L.; DE FERRARI, M.; FORNI, A.; LANDO, C. *et al.* Influence of sex on cytogenetic end points: evidence from a large human sample and review of literature. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 4, p. 671–679, 1995.

BOOGAARD, P.J., BEULINK, G.D.J. and VAN SITTEERT, N. J. Biological monitoring of exposure to 3-chloro-4-fluoriline by determination of a urinary metabolite and a haemoglobin adduct. **Environmental Health Perspectives**, v. 102, p. 23–25. 1994.

BORTOLI, GIORGIA MOURA DE, MARIANA BARBIERI DE AZEVEDO, LUCIANO BASSO DA SILVA. 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.

BOTTO, N. ANDREASSI, M.G. MANFREDI, S. MASETTI, S. COCCI, F. COLOMBO, M.G. STORTI, S. RIZZA, A. BIAGINI, A. Genetic polymorphisms in folate and homocysteine metabolism as risk factors for DNA damage, **European Journal of Human Genetics** polymorphisms. v. 11, p. 671–678, 2003.

BRASIL. Lei nº 8080. Dispõe sobre as condições para a promoção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, 19 set. 1990. Sec. I, p. 18055-18059.

BRASIL. Ministério da Saúde. Representação no Brasil da OPAS/OMS. **Doenças relacionadas ao trabalho**: manual de procedimentos para os serviços de saúde. Brasília, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. **Manual de vigilância da saúde de populações expostas a agrotóxicos**. Brasília, DF, 1997.

BRENDLER-SCHWAAB, S.; HARTMANN, A.; PFUHLER, S.; SPEIT, G. The in vivo comet assay: use and status in genotoxicity testing. **Mutagenesis**, v. 20, n. 4, p. 245–254, 2005.

BRESCIA, G., CELOTTI, L., CLONFERO, E., NEUMANN, G. H., FORNI, A., FOA, V., PISONI, M., FERRI, G. M. AND ASSENNATO, G. The influence of cytochrome P450 1A1 and glutathione S-transferase M1 genotypes on biomarker levels in coke-oven workers. **Archives of Toxicology**, v. 73, p. 431–439, 1999.

BROGGER, A., NORUM, R., HANSTEEN, I. L. *et al.* Comparison between five Nordic laboratories on scoring of human lymphocyte chromosome aberrations. **Hereditas**, v. 100, p. 209–218, 1984.

BUKVIC, N., GENTILE, M., SUSCA, F., FANELLI, M., SERIO, G., BUONADONNA, L., CAPURSO, A. AND GUANTI, G. Sex chromosome loss, micronuclei, sister chromatid exchange and aging: a study including 16 centenarians. **Mutation Research**, v. 498, p. 159–167, 2001.

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

BURGAZ S, KARAHALIL B, BAYRAK P, TASKIN L, YAVUZASLAN F, BOKESYOY I, ANZION RB, BOS RP, PLATIN N. Urinary cyclophosphamide excretion and micronuclei frequencies in peripheral lymphocytes and in exfoliated buccal epithelial cells of nurses handling antineoplastics. **Mutation Research**, v. 439, p. 97–104, 1999.

CAIRES, S.M; CASTRO, J.G.D; Levantamento dos agrotóxicos usados por produtores rurais do município de alta Floresta – Mato Grosso. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**; v. 2, n. 1, 2002.

CALDAS, E. D.; SOUZA, L. C. Assessment of the chronic risk for ingestion of pesticide residues in the Brazilian diet. **Revista de Saúde Pública** , v. 34, n. 5, p. 529-537, 2000.

CALDAS, L.Q.A. **Intoxicações exógenas agudas por carbamatos, organofosforados, compostos bipiridílicos e piretróides**. CENTRO DE CONTROLE DE INTOXICAÇÕES. HOSPITAL UNIVERSITÁRIO ANTÔNIO PEDRO. UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE. Niterói-RJ, 2000.

CARBONELL E; VALBUENA A; XAMENA N;CREUS A; MARCOS R. Temporary variations in chromosomal aberrations in a group of agricultural workers exposed to pesticides, **Mutation Research**; v. 344, p. 127–134, 1995.

CARRANO, A., NATARAJAN, *et al*. Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques International Commission for protection against Environmental Mutagens and Carcinogens (ICPEMC publication 14). **Mutation Research**, v. 204, p. 379-406, 1988.

CARVALHO, MB, RAMIREZ A, GATTAS GJ, GUEDES AL, AMAR A, RAPOPORT A, BARAUNA NETO JC, CURIONI AO. Relationship between the outcome and the frequency of micronuclei in cells of patients with oral and oropharyngeal carcinoma, São. **Revista da Associação Médica Brasileira**; 48:317–322, 2002.

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. **Revista da Sociedade Brasileira de Toxicologia**.; v.1, p. 60-64, 1988.

CARVALHO, S. M. **Padrões de exposição diferencial ao tiametoxam e variação sazonal da atividade enzimática em apis mellifera**: potencial como indicadora da qualidade ambiental. Disponível em: < <http://>

www.bv.fapesp.br/pt/bolsas/45345/padroes-exposicao-diferencial-tiametoxam-variacao>. Acesso em: 09 dez. 2010.

CASTRO, L.F.C.; GOMES, J.M.A. Atividades Agrícolas no Assentamento Iracema (PI) e suas repercussões sobre o Meio Ambiente. *Revista Internacional de Desenvolvimento Local*. v. 8, n 1, p. 65-73, Mar. 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/inter/v8n1/a07v8n1.pdf>.

CELIK A, AKBAS E. Evaluation of sister chromatid exchange and chromosomal aberration frequencies in peripheral blood lymphocytes of gasoline station attendants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 60, p. 106–12, 2005.

CELIK A, CAVAS T AND ERGENE-GOZUKARA S Cytogenetic biomonitoring in petrol station attendants: micronucleus test in exfoliated buccal cells. **Mutagenesis**; v. 18, p. 417-421, 2003.

CELIK, A.; KANIK A. Genotoxicity of occupational exposure to wood dust. Micronucleus frequency and nuclear changes in exfoliated buccal cells. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 47, n. 9, p. 693-698, 2006.

CEPPI,M; BIASOTTI, B; FENECH, M; and BONASSI, S. Human population studies with the exfoliated buccal micronucleus assay: statistical and epidemiological issues. **Mutation Research**, v.705, n.1, p.11-19, (2010).

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 radiografies. **Mutation Research**, v. 562, p. 111-117, 2004.

CHAVES, T.V.S. **Avaliação do impacto do uso de agrotóxicos nos trabalhadores rurais de Ribeiro Gonçalves, Baixa Grande do Ribeiro e Uruçuí - PI**. (Dissertação de mestrado). Departamento de Fisiologia e Farmacologia. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

CHEN, C., ARJOMANDI, M., QIN,H., BALMES,J., TAGER,I. and HOLLAND,N. Cytogenetic damage in buccal epithelia and peripheral of young healthy individuals exposed to ozone. **Mutagenesis**, v. 21, p. 131-137, 2006.

CIMINO M.C. Comparative overview of current international strategies and guidelines for genetic toxicology testing for regulatory purposes. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 47, p. 362-390, 2006.

COLLINS, A.R. Investigating oxidative DNA damage and its repair using the comet assay. **Mutation Research**, MUTREV, p. 1–9, 2008.

COLLINS, A.R. The Comet assay for DNA damage and repair: principles, applications and limitations. *Mol. Biotechnology*; v. 26, p. 249–261, 2004.

COMMITTEE ON CARCINOGENICITY. Committees on: Toxicity, Mutagenicity, Carcinogenicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment. **Annual Reports**, [S.I.]: Department of Health, 1995.

COMMITTEE ON MUTAGENICITY. **Alcoholic Beverages**: Update on Information Published 1995–2000. [S.I.], 2000.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Levantamento de Safra**: Piauí, 2009. Teresina, 2010.

COSTA C, Silva S, Coelho P, Roma-Torres J, Teixeira JP, Mayan O. Micronucleus analysis in a Portuguese population exposed to pesticides: preliminary survey. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, 210:415–8, 2007.

COUTINHO, C.F.B., MAZO, L.H. Complexos Metálicos com o Herbicida Glifosato: Revisão. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 1038-1045, 2005.

DA SILVA AUGUSTO LG, LIEBER SR, RUIZ MA, DE SOUZA CA. Micronucleus monitoring to assess human occupational exposure to organochlorides. **Environmental and Molecular Mutagenesis**; v. 29, p. 46–52, 1997.

DA SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003.

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

DA-SILVA, J. ; MORAES, C. R. ; HEUSER, V. D. ; ANDRADE, V. ; SILVA, F. R. ; KVIKTO, K. ; EMMEL, V. ; ROHR, P. ; Bordin, L. D. ; ANDREAZZA, A. C., SALVADOR, M. ; HENRIQUES, J. A. P. ; 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, p. 415-422, 2008.

DAVIES HW, KENNEDY SM, TESCHKE K, JENNY P, QUINTANA E. Cytogenetic analysis of South Asian 175rea175 pickers in British Columbia using the micronucleus assay in peripheral lymphocytes. **Mutation Research**; v. 416, p. 101–113, 1998.

DEARFIELD, K.L. AND MOORE, M.M. Use of genetic toxicology information for risk assessment, **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 46, p. 236-245, 2005.

DEARFIELD, K.L., CIMINO, M.C., MCCARROLL, N.E., MAUER, I., VALCOVIC, L.R. Genotoxicity risk assessment: a proposed classification strategy. **Mutation Research**, v. 521, p. 121–135, 2002.

DECORDIER ILSE, PAPINE, ALEXANDER PLAS, GINA ROESEMS, SAM VANDE LOOCK, KIM MORENO-PALOMO, JENNIFER CEMELI, EDUARDO ANDERSON, DIANA FUCIC, ALEKSANDRA MARCOS, RICARDO FRANC XOISE SOUSSALINE AND KIRSCH-VOLDERS MICHELINE. Automated image analysis of cytokinesis-blocked micronuclei: an adapted protocol and a validated scoring procedure for biomonitoring **Mutagenesis**, v. 24, n. 1, p. 85–93, 2009.

DEHON, G. *et al.* Validation of an automatic comet assay analysis system integrating the curve fitting of combined comet intensity profiles. **Mutation Research**, v. 650, n. 2, p. 87-95, 2008.

DOLES REAGENTES. 2008. Disponível em: < <http://www.doles.com.br/prods.html> >. Acesso em: 10 mar. 2011.

DUSINSKA, M.; COLLINS, A. R. The comet assay in human biomonitoring: gene–environment interactions. **Mutagenesis**, v. 23, n. 3, p. 191–205, 2008.

ECOBICHON, D. J. Toxic effects of pesticides. In: CASARETT, L. J. *et al.* **Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons**. 5th ed. New York: Curtis D. Klaassen, 1996. cap. 22, p. 643-649.

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.

ERDTMANN, B. A genotoxicidade nossa de todos os dias. In: SILVA, Juliana da; Erdtmann, Bernardo; Henriques, João Antonio da Silva. (ORG) **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003.

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

FAIRBAIRN, D. W., OLIVE P. L. AND O'NEILL, K. L. The Comet assay: a comprehensive review. **Mutation Research**, v. 339, p. 37–59, 1995.

FAN, W., WANG, W.L., DING, S., ZHOU, Y., JIN, F.S. Application of micronucleus test of buccal cells in assessing the genetic damage of workers exposed to acrylonitrile. *Zhonghua Lao Dong Wei Shing Ye Bing Zazhi*, v. 24, p. 8–106, 2006.

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

FARIA, N. M. X; FACCHINI, L.A; FASSA, A.G. and TOMASI, E. Trabalho rural e intoxicações por agrotóxicos. **Caderno de Saúde Pública [online]**. ISSN 0102-311X vol. 20, n. 5, p. 1298-1308, 2004.

FARMER, P. B. AND EMENY, J. M. (eds) Biomarkers of Carcinogen Exposure and Early Effects. ECNIS, The Nofer Institute of Occupational Medicine, Lodz. Correlation between biomarkers of human exposure to genotoxins with focus on carcinogen-DNA adducts **Mutagenesis**, vol. 23, no. 1, p. 1–18. 2006.

FARMER, P.B. AND SINGH, R. Use of DNA adducts to identify human health risk from exposure to hazardous environmental pollutants: the increasing role of mass spectrometry in assessing biologically effective doses of genotoxic carcinogens. **Mutation Research**, v.544, p. 397-402, 2008.

FAUST, F., KASSIE, F., KNASMULLER, S., KEVEKORDES, S. AND MERSCH SUNDERMANN, V. Use of primary blood cells for the assessment of exposure to occupational genotoxicants in human biomonitoring studies. **Toxicology**, v. 198, p. 341–350, 2004.

FENECH, J.W. M. CROTT, Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes-evidence for breakagefusion-bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay, **Mutation Research**, v. 504, p. 131–136, 2002.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a “cytome” assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death, **Mutation Research**. v 600, p. 58–66, 2006.

FENECH, M. Important variables that influence base-line micronucleus frequency in cytokinesis-blocked lymphocytes—a biomarker for DNA damage in human populations. **Mutation Research**, v. 404, p. 155–165, 1998.

FENECH, M. The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. **Mutation Research**, v. 285, p. 35–44, 1993.

FENECH, M. The in vitromicronucleus technique, **Mutation Research**, v. 455 p. 81–95 n. 8, 2000.

FENECH, M., BAGHURST, P., LUDERER, W., TURNER, J., RECORD, S., CEPPI, M. and BONASSI, S. Low intake of calcium, folate, nicotinic acid, vitamin E, retinol, beta-carotene and high intake of pantothenic acid, biotin and riboflavin are significantly associated with increased genome instability—results from a dietary intake and micronucleus index survey in South Australia. **Carcinogenesis**, v. 26, p. 991–999, 2005.

FENECH, M., GROTT, J., TURNER, J. and BROOWN, S. Necrosis, apoptosis, cytostasis and DNA damage in human lymphocytes measured simultaneously within the cytokinesis blockmicronucleous assay: description of the method and results for hydrogen peroxide. **Mutagenesis**, v. 14, n. 6, p. 605-612, 1999a.

FENECH, M., HOLLAND, N., CHANG, W.P., ZEIGER, E., BONASSI, S. The human MicroNucleus Project—an international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. **Mutation Research**, v. 428, p. 271-283, 1999b.

FRITZ, G. and KAINA, B. Rho GTPases: promising cellular targets for novel anticancer drugs. *Curr. n 6*, 1–142, 3, 2006.

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 and Development** ; v.33, n. 3, p.246-8, 2007.

GARAJ-VHROVAC, V.; ZELJEZIC, D. Evaluation of DNA damage in workers occupationally exposed to pesticides using single-cell gel electrophoresis (SCGE) assay. Pesticide genotoxicity revealed by the comet assay, **Mutation Research**, 469. 279–285. 2000.

GARAJ-VRHOVAC, V.; KOPJAR, N. Micronuclei in cytokinesis blocked lymphocytes as index of occupational exposure to antineoplast drugs. **Radiology Oncology**, v. 32 p. 385-392, 1998.

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

GARCIA, E.G. **Aspectos de prevenção e controle de acidentes no trabalho com agrotóxicos**. São Paulo: MTE/FUNDACENTRO, 2005.

GARCIA, E.G. **Segurança e Saúde no trabalho rural com agrotóxicos: contribuição para uma abordagem mais abrangente**. Dissertação de mestrado. Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.

GAUTHIER, E., FORTIER, I., COURCHESNE, F., PEPIN, P., MORTIMER, J. AND GAUVREAU, D. Environmental pesticide exposure as a risk factor for Alzheimer's disease: a case-control study. **Environmental Research**, v. 86, p. 37–45, 2001.

GILLET, L.C. SCHAERER, O.D. Molecular mechanisms of mammalian global nucleotide excision repair, **Chemical Reviews**, v. 106, p. 253–276, 2006.

GILMAN, G. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 9. ed. Rio de Janeiro: MacGrawHill, 2006.

GÓMEZ-ARROYO S, DÍAZ-SÁNCHEZ Y, MENESES-PÉREZ M, VILLALOBOS-PIETRINI R, RODRÍGUEZ JL. Cytogenetic biomonitoring in a Mexican floriculture worker group exposed to pesticides. **Mutation Research**; v. 466, p.117–124, 2000.

GONSEBATT ME, DEL VALLE M, FOURTOUL T, PINTO D, CEBALLOS JM, GARCIA G. Micronucleus (MN) frequency in nasal respiratory epithelium from young adults living in urban areas with different levels of air pollution, **Mutation Research**, v. 379, p.198, 1997.

GONTIJO, A. M. M. C.; TICE, R. Teste do cometa para detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. In: _____. **Mutagênese Ambiental**. Porto Alegre: Editora da ULBRA, p. 247-279, 2003

GONZALEZ, M.; MIGLIORANZA, K.S.B.; MORENO, J.E.A.; MORENO, V. J. Evaluation of conventionally and organically produced vegetables for high lipophilic organochlorine pesticide (OCP) residues. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, n. 2, p. 261-269, 2005.

GOODE, R.; E.L. ULRICH, C.M. POTTER J.D. Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk,. **Biomarkers & Prevention**. v.11, p.1513–1530, 2002.

GORBUNOVA, V. SELUANOV, A. Making ends meet in old age: DSB repair and aging, **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 126, p. 621–628, 2005.

GROVER, P; DANADEVI, K; MAHBOOB, M; ROZATI, R; SALEHA BANU, B; RAHMAN, M.F. Evaluation of genetic damage in workers employed in pesticide production utilizing the comet assay. **Mutagenesis**, v. 18, n.2, p. 201-215, 2003

GUTERRES, E. **Efeitos Nocivos do Glifosato**. Porto Alegre, 2003. Disponível em : <<http://www.consciencia.net/2003/10/19/glifosato.html>>. Acesso em: 12 abr. 2010.

GUZMAN, P., SOTELO-REGIL, R.C., MOHAR, A., GONSEBATT, M.E. Positive correlation between the frequency of micronucleated cells and dysplasia in Papanicolau smears. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.41 p. 339–343, 2003.

GYORFFY, E., ANNA, L., KOVÁCS, K., RUDNAI, P. AND SCHOKET. B. Correlation between biomarkers of human exposure to genotoxins with focus on carcinogen–DNA adducts **Mutagenesis**, v. 23, n. 1, p. 1–18, 2008.

GRISOLIA, C. K. A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomycin C and various pesticides. **Mutation Research**, v. 518, p. 145-150, 2002.

HAGMAR L., STROMBERG U., BONASSI S., HANSTEEN I.L., KNUDSEN, L.E. LINDHOLM, NORPPA, C. H. Impact of types of lymphocyte chromosomal aberrations on human cancer risk: results from Nordic and Italian cohorts, **Cancer Research**, v. 64, p. 2258–2263, 2004

HANAHAN, D. & WEINBERG, R.A. The hallmarks of cancer. **Genes to cells**, v. 100, p. 57-70, 2000.

HARTMANN, A., PLAPPERT, U., POETTER, F. *et al.* Comparative study with the alkaline Comet assay and the chromosome aberration test. **Mutation Research**; v. 536, p. 27–38, 2003.

HAYES, R. B., ZHANG, L., SWENBERG, J. A. *et al.* Markers of carcinogenicity among butadiene-polymer workers in China. *Chem.* **Chemico-Biological Interactions**, p.135-136, p.455–464, 2001.

HENRY, J.B. **Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais**,. 20ed. Barueri: Manole, 2008.

HERNÁNDEZ, A.F; 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. **Environmental Research**, v.102, n.1, p. 70-76, 2006.

HEUSER, V.D., ANDRADE, V.M., SILVA, J., ERDTMANN, B. Comparison of genetic damage in brazilian footwear-workers exposed to solvent-based adhesive. **Mutation Research**, v. 583, p. 85-94, 2005.

HODGSON, E. SILVER, I. S.; BUTLER, L. E.; LAWTON, M. P.; LEVI, P.E. Metabolism. In: HAYES, W. J.; LAWS, E. R. (Ed.). **Handbook of Pesticides Toxicology**. San Diego: Academic Press, San Diego, p. 106-167, 1991

HOFFMANN, H. AND SPEIT, G. Assessment of DNA damage in peripheral blood of heavy smokers with the comet assay and the micronucleus test. **Mutation Research**, v. 581, p.105–114, 2005.

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.

HUAWEI DUANA, SHUGUANG LENG, ZUFEI PANB, YUFEI DAI, YONG NIUA, CHUANFENG HUANGA, PING BINA, YADONGWANGA, QINGJUN LIUA, WEN CHENC, YUXIN ZHENG (2009) Biomarkers measured by cytokinesis-block micronucleus cytome assay for evaluating genetic damages induced by polycyclic aromatic hydrocarbons. **Mutation Research**, v. 677, p.93–99, 2009.

HUSGAFVEL-PURSIAINEN, K. Genotoxicity of environmental tobacco smoke: a review, **Mutation Research**, v. 567, p. 427–445, 2004.

IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Ionizing Radiation, Part I, X- and Gamma-Radiation and Neutrons. LYON, FRANCE, 26 May–2 June 1999. IARC **Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans**, 75 Pt ,1, p. 1–448, 2000.

IARMARCOVAI, G. BONASSI, S. BOTTA, A., BAAN, R.A., ORSIE, T. `RE A. Genetic polymorphisms and micronucleus formation: A review of the literature. **Mutation Research**, v. 658, p. 215–233, 2008

IARC. **Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Occupational Exposures in Insecticide Application and Some Pesticides**. Lyon, 1991. v. 53.

IARC. **Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans**. Lyon, 2002.

IBGE. Diretoria de Pesquisas. Coordenação de Trabalho e Rendimento. **Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílio**. Rio de Janeiro, 2007.

IBGE. **Censo agropecuário**: Brasil, Grandes Regiões e Unidades da Federação. Rio de Janeiro, 2006.

JAGA, K. AND DHARMANI, C. Epidemiology of pesticide exposure and cancer: a review. **Reviews on Environmental Health**, v. 20, p. 15–38, 2005.

JAGETIA, G.C., JAYAKRISHNAN, A., FERNANDES, D., VIDYASAGAR, M.S. Evaluation of micronuclei frequency in the cultured peripheral blood lymphocytes of cancer patients before and after treatment. **Mutation Research**, v. 491, p. 9-16, 2001.

JAMIL, K., SHAIK A. P, MAHBOOB M, KRISTNA, D. Effect of organophosphorus and organochlorine pesticides (monochrotophos, chloryriphos, dimethoate, and endossulfan) on human lymphocytes in vitro. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 27, p. 133-44, 2004.

JI, B. T., SILVERMAN, D. T., STEWART, P. A. *et al.* Occupational exposure to pesticides and pancreatic cancer. **American Journal of Industrial Medicine**, v. 39, p. 92–99, 2001.

JIAO, X. J. HUANG, S. WU, M. LV, Y. HU, X. JIANFU, X. SU, C. LUO, B. Ce, hOGG1 Ser326Cys polymorphism and susceptibility to gallbladder cancer in a Chinese population, **International Journal of Cancer**, v. 121, p. 501–505, 2007.

KAGABU, S. Chloronicotinyl insecticides: discovery, application and future perspective. **Reviews in Toxicology**, v. 1, n. 7-8, p. 75-129, 1997.

KARABAY UN, OGUZ GM. Cytogenetic and genotoxic effects of the insecticides, imidacloprid and methamidophos, **Genetics and Molecular Research**,. v. 4 n. 4, p. 53-662, 2005.

KASAHARA, S. **Introdução à pesquisa em citogenética de vertebrados**. 1. ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética 2009.

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 Biochemistry and Function**, v. 24, p. 327-332, 2006.

KHUDER, S.A. and MUTGI, A.B. Meta-analyses of multiple myeloma and farming. **American Journal of Industrial Medicine**, v. 32, p. 510–551, 1997.

KIRSCH-VOLDERS, M. MATEUCA, R.A ROELANTS,. M. TREMP, A. ZEIGER, E. BONASSI, S. HOLLAND, N. CHANG, W.P. AKA, P.V. DEBOECK, M. GODDERIS, L. HAUFROID, V. ISHIKAWA, H. LAFFON, B. MARCOS, R. MIGLIORE, L. NORPPA, H. TEIXEIRA, J.P. ZIJNO, A. FENECH, M. The effects of GSTM1 and GSTT1 polymorphisms on micronucleus frequencies in human lymphocytes in vivo, **Cancer Epidemiol. Biomarkers & Prevention**, v. 15 , p. 1038–1042, 2006

KIRSCH-VOLDERS, M., FENECH, M. Inclusion of micronuclei in non-divided mononuclear lymphocytes and necrosis/ apoptosis may provide a more comprehensive cytokinesis block micronucleus assay for biomonitoring purposes. **Mutagenesis**, v. 16, p. 51-58, 2001.

KNUDSEN, L.E., HANSEN, A.M. Biomarkers of intermediate endpoints in environmental and occupational Health. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 210, n. 3-4, p. 461-70, 2007.

KOPPEN, G., VERHEYEN, G., MAES, A. *et al.* A battery of DNA effect biomarkers to evaluate environmental exposure of Flemish adolescents. **Journal of Applied Toxicology**, v. 27, p. 238–246, 2007.

KULTZ, D. Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response. **Annual Review of Physiology**, v. 67, p. 225–257, 2005.

KYRTOPOULOS, S.A., SARRIF, A., AUTRUP, H., FARMER, P., KNUDSEN, L.E., MATHAR, U., VRIJHOF, H. Biomarkers and molecular epidemiology—present state and future trends: Introduction and overview Editorial / **Mutation Research**, v. 600, p. 1–2, 2006.

LAFIURA, K.M., BIELAWSKI, D.M., POSECION, N.C., OSTREA, E.M., MATHERLY, L.H., Jeffrey W. TAUB and Yubin GE. Association between prenatal

pesticide exposures and the generation of leukemia-associated T(8;21) **Pediatric Blood & Cancer**, v. 49, Issue 5, 15; p. 624–62, 2007.

LANDIN, H. H., GRUMMT, T., LAURENT, C. AND TATES, A. D. Monitoring of occupational exposure to epichlorohydrin by genetic effects and haemoglobin adducts. **Mutation Research**, v. 381, p. 217–226, 1997.

LARINI, Lourival. **Toxicologia**. 3. ed. São Paulo: Manole, 1997.

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.

LEAR, J.T., HEAGERTY, A.H.M., SMITH, A., *et al*, Multiple cutaneous basal cell carcinomas: glutathione S-transferases GSTM1, GSTT1 and cytochrome P450 CYP2D6,. CYP1A1 polymorphism influence tumour numbers and ac. crucial, **Carcinogenesis**, v. 17, p. 1891–1896, 1996.

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.

LEVIGARD, Y.E. **A interpretação dos profissionais de saúde acerca das queixas do nervoso no meio rural: uma aproximação ao problema das intoxicações por agrotóxicos** [dissertação]. Rio de Janeiro (RJ): Escola Nacional de Saúde Pública; 2001.

LIMA, O. A. *et al*. **Métodos de laboratório aplicados à clínica** . 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1977.

LINDBERG, H.K. ANG, X. JARVENTAUS, WH. FALCK, G.C. NORPPA, H. FENECH, M. Origin of nuclear buds and micronuclei in normal and folate-deprived human lymphocytes, **Mutation Research**, v. 617, p. 33–45, 2007.

LÓPEZ, O; HERNÁNDEZ, A.F; RODRIGO, L; GIL, F; PENA, G; SERRANO, J.L. Changes in antioxidant enzymes in humans with long-term exposure to pesticides. **Toxicology Letters**, v. 171, p.146–53, 2007.

LUCERO,L., PASTOR,S., SUÁREZ,S., DURBÁN,R., GÓMEZ,C., PARRÓN,T., CREUS,A. and MARCOS,R. Cytogenetic biomonitoring of Spanish greenhouse workers exposed to pesticides: micronuclei analysis in peripheral blood lymphocytes and buccal epithelial cells. **Mutation Research**, v. 464, p. 255–262, 2000.

MAFFEI, F., FORTI, G. C., CASTELLI, E., STEFANINI, G. F., MATTIOLI, S. AND HRELIA, P. Biomarkers to assess the genetic damage induced by alcohol abuse in human lymphocytes. **Mutation Research**, v. 514, p. 49–58, 2002.

MALUF, S.W., ERDTMANN, B. Biomonitoração do dano genético em humanos. In: SILVA, J. DA; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. (Orgs.) **Genética toxicológica**. Porto Alegres: Editora: Alcance, p. 183-205, 2003.

MARICONI, F. A. M. **Inseticidas e seu Emprego no Combate às Pragas**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 1980.

MARONI, M. and. FAIT, A. Health effects in man from long-term exposure to pesticides. A review of the 1975–1991 literature. **Toxicology**, v. 78: p. 1-180, 1993.

MÁRQUEZ, C., VILLALOBOS, C., POBLETE, S., VILLALOBOS, E, De LOS ANGELES GARCIA M, DUK, S. Cytogenetic damage in female Chilean agricultural workers exposed to mixtures of pesticides. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 45, p. 1–7, 2005.

MASTRANGELO G; GRANGE JM; FADDA E,*et al.* *Lung cancer risk: effect of dairy farming and the consequence of removing that occupational exposure*. **American Journal of Epidemiology**, v. 161, p.1037-1046, 2005.

MATEUCA, R. LOMBAERT, N. AKA, P.V. DECORDIER, I. KIRSCH-VOLDERS, M. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring, **Biochimie**, v. 88, p. 1515–1531, 2006.

MATOS, G.B., SANTANA, O.A.M., NOBRE, L.C.C.N. Intoxicação por agrotóxico. In: BAHIA. Secretaria da Saúde do Estado. Superintendência de Vigilância e Proteção da Saúde. Centro de Estudos da Saúde do Trabalhador. (Org). **Manual de normas e procedimentos técnicos para a vigilância da saúde do trabalhador** p. 249-280. Salvador, 2002.

MELIKIAN, A. A., MALPURE, S., JOHN, A., MENG, M., SCHOKET, B., MAYER, G., VINCZE, I., KOLOZSI-RINGELHANN, A. AND HECHT, S. S. Determination of hemoglobin and serum albumin adducts of benzo[a]pyrene by gas chromatography-mass spectrometry in humans and their relations to exposure and to other biological markers. **Polycyclic Aromatic Compounds**, v.17, p. 125–134, 1999.

MENDES, R.; DIAS, E. C. Saúde dos trabalhadores. In: ROUQUAYROL, M. Z.; ALMEIDA FILHO, N. de. **Epidemiologia e Saúde**. 5. ed. Rio de Janeiro: Medsi. p. 431-456, 1999.

MENTEM, J.O. Liderança em Tecnologia Fitossanitária. **Revista Agroanalysis**. Edição N° 04, volume 29, 2009.

MIGLIORE, L.; PARRINI, M.; SBRANA, I., BATTAGLIA, A., LOPRIENO, N. Micronucleated lymphocytes in people occupationally exposed to potential environmental contaminants: the age effect, **Mutation Research**, v. 256 n. 1; p.13-20, 1991.

MILATOVIC, D., GUPTA, R.C., ASCHNER, M. Anticholinesterase toxicity and oxidative stress. **Science World Journal**, v.6, p. 295–310, 2006.

MILATOVIC, D; GUPTA, R.C; DEKUNDY, A; MONTINE, T.J; Dettbarn, W.D. Carbofuran-induced oxidative stress in slow and fast skeletal muscles: prevention by memantine and atropine. **Toxicology**, v. 208, p.13–24. 2005

MINOZZO, R.; DEIMLING, L.I.; SANTOS-MELLO, R. Cytokinesis-blocked micronucleus cytome and comet assays in peripheral blood lymphocytes of workers exposed to lead considering folate and vitamin B12 status. **Mutation Research**, v. 697, p. 24–32, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Vigilância em Saúde Ambiental**: III Informe Unificado das Informações sobre Agrotóxicos Existentes no SUS. Brasília, 2009. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1494>. Acesso em: 05 jul. 2011.

MOORHEAD PS, NOVELL WJ, WELLMAN DM, BATLIPS D, HUNGERFORD A. Chromosome preparations of leucocytes cultured from peripheral blood. **Experimental Cell Research**; v. 20, p. 613–616, 1960.

MORI T, ANAZAWA Y, IIZUMI M. Identification of the interferon regulatory factor 5 gene (IRF-5) as a direct target for p53. **Oncogene**, v. 25, p. 2914-2918, 2002.

MOURA, D. J; RICHTER M. F; HENRIQUES J.A.P. SAFFI J. Antioxidant properties of betacarboline alkaloids are related to their antimutagenic and antigenotoxic activities. **Mutagenesis**; v. 22, p. 293-302, 2007.

MOUSTACCHI, E. DNA damage and repair: consequences on dose-responses. **Mutation Research**, v. 464, p. 35-40, 2000.

MUNIZ, J.F., MCCAULEY, L., SCHERER, J., LASAREV, M., KOSHY, M., KOW, Y.W. Biomarkers of oxidative stress and DNA damage in agricultural workers: a pilot study. **Toxicology and Applied Pharmacology**; v. 227, p. 97–107, 2008.

MUSAKA, L. SOUCEKC, PAVEL. VODICKOVAC, L.; NACCARATI, A.; HALASOVAA, E.; POLAKOVAD, V.; SLYSKOVAD, J.; SUSOVAC, S.; BUCHANCOVAB, J.; SMERHOVSKY, Z.; SEDIKOVAF, J.; KLIMENTOVAB, G.; OSINAG, O.; HEMMINKI, K.; VODICKAD, P. Chromosomal aberrations in tire plant workers and interaction with polymorphisms of biotransformation and DNA repair genes. **Mutation Research**, v. 647, n. 1, p. 36–42, 2008.

NASCIMENTO, P. A., SILVA, M A., OLIVEIRA, E.M., SUZUKI, M. F., KAZAKI, K. Evaluation of radioinduced damage and repair capacity in blood lymphocytes of breast cancer patients. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research.**, v. 34, p.165-176, 2001.

NGATEA, J.; MGENI, A. Y. The effects of continuous exposure to organophosphorus and carbamate insecticides on cholinesterase levels in human. In: TORDOIR, W. E.; VAN HEEMSTRA, E. A. H (Ed.). **Field worker exposure during pesticide application.** Amsterdam: Elsevier,1980. p. 63-66.

NORPPA, H. Cytogenetic biomarkers and genetic polymorphisms. **Toxicology Letters**, v. 149, p. 309–334, 2004.

NORPPA, S. H., BONASSI, L.L. HANSTEEN, L. HAGMAR, U. STROMBERG, P. ROSSNER, P. BOFFETTA, C. LINDHOLM, S. GUNDY, J. LAZUTKA, A. CEBULSKA-WASILEWSKA, E. FABIANOVA R.J. STRAM, L.E. KNUDSEN, R. BARALE, A. FUCIC, Chromosomal aberrations and SCEs as biomarkers of cancer risk, **Mutation Research**, v. 600, p. 37–45, 2006. 2006.

OLIVEIRA, R. A. G. **Hemograma:** como fazer e interpretar. São Paulo: Livraria Médica Paulista Editora, 2007.

OLIVEIRA, V.S., LIMA, J.M., CARVALHO, R.F. and RIGITANO, R.L.O. Sorção do inseticida tiametoxam em latossolos sob efeito de fosfato e vinhaça. **Química Nova [online]**. v.32, n.6, p. 1432-1435. ISSN 0100-4042, 2009.

OLIVEIRA-SILVA, J. J. ALVES, S. R; MEYER, A; PEREZ, F; SARCINELLI, P.N; MATTOS, R.C.O.C; C MOREIRA, J.C. Influência de fatores socioeconômicos na contaminação por agrotóxicos, Brasil. **Revista de Saúde Pública [online]**, v.35, n.2, p. 130-135, 2001.

OMS. **Public health impact of pesticides used in agriculture.** Genebra, 1990.

OMS/OPAS. **Manual de Vigilância da Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos.** Brasília: Representação do Brasil, 1996.

ORTIZ-PÉREZ, M.D., TORRES-DOSAL, A., BATRES L.E., LÓPEZ-GUZMÁN, O.D., GRIMALDO, M., CARRANZA, C. Environmental Health Assessment of Deltamethrin in a Malarious Area of Mexico: Environmental Persistence, Toxicokinetics, and Genotoxicity in Exposed Children. **Environmental Health Perspectives**, v. 113, p. 782-786. doi:10.1289/ehp.7652, 2005.

OZKUL Y, DONMEZ H, ERENMEMISOGLU A, DEMIRTAS H, IMAMOGLU N. Induction of micronuclei by smokeless tobacco on buccal mucosa cells of habitual users, **Mutagenesis**, v.12; p. 285–287, 1997.

PADMAVATHI, P., PRABHAVATHI, A.P. and Reddy, P.P. Frequencies of SCEs in peripheral blood lymphocytes of pesticides workers. *Bull. Environmental Contamination and Toxicology*, v. 64, p. 155–160, 2000.

PAGANA, K. D.; PAGANA, T.J. **Manual de Testes e Diagnósticos e Laboratoriais**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

PASTINK, A., EEKEN, J.C.J., LOHMAN, P.H.M. Genomic integrity and the repair of double-strand DNA breaks. *Mutation Research*, v. 480-481, p.37-50, 2001.

PASTOR S, CREUS A, PARRÓN T, CEBULSKA-WASILEWSKA A, SIFFEL C, PIPERAKIS S, *et al.* Biomonitoring of four European populations occupationally exposed to pesticides: use of micronuclei as biomarkers. *Mutagenesis*, v. 18, n. 3, p. 249–258, 2003.

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

PASTOR S, LUCERO L, GUTIERREZ S, DURBAN R, GOMEZ C, PARRON T, CREUS A, MARCOS R. A follow-up study on micronucleus frequency in Spanish agricultural workers exposed to pesticides. *Mutagenesis*; v. 17, p. 79–82, 2002.

PERERA, F. P., TANG, D. L., O'NEILL, J. P. *et al.* HPRT a glycophorin A mutations in foundry workers: relationship to PAH exposure and to PAH-DNA adducts. *Carcinogenesis*, v. 14, p. 969–973, 1993.

PERES, F; MOREIRA, J.C. (Org.) **É veneno ou é remédio? Agrotóxicos, saúde e ambiente**. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 2003.

PERES, F., OLIVEIRA-SILVA, J.J., DELLA-ROSA, H.V. and LUCCA, S.R. Desafios ao estudo da contaminação humana e ambiental por agrotóxicos. *Ciência & Saúde Coletiva [online]*. v.10, suppl., p. 27-37. ISSN 1413-8123, 2005.

PÉREZ-MALDONADO, I.N., ATHANASIADOU, M., YÁÑEZ, L., GONZÁLEZ-AMARO, R., BERGMAN, A., and DÍAZ-BARRIGA, F. DDE-induced apoptosis in children exposed to the DDT metabolite, *Science of the Total Environment*, v. 370 p. 343–351, 2006.

PIAUÍ. Secretaria de Desenvolvimento Rural. **Relatório**. Teresina, 2004.

RADACK, K. L., PINNEY, S. M. AND LIVINGSTON, G. K. Sources of variability in the human lymphocyte micronucleus assay: a population-based study. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 26, p. 26–36, 1995.

RAMOS, M.E.S.P. **Biomonitoramento genético de indivíduos expostos ocupacionalmente a agrotóxicos no povoado Vila Bessa, município de**

Conceição do Jacuípe-Bahia. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

RATNER, D., OREN, B., VIDGER, K., Chronic dietary anticholinesterase poisoning. **Israel Journal of Medical Sciences**, v. 19, p. 810-814, 1983.

REKHA, S.N. NAIK, R. P. Pesticide residue in organic and conventional food–risk analysis, **Chem. Health Safety**, v.13, p. 12–19, 2006.

REMOR, A.P., TOTTI, C.C., MOREIRA,D.A., DUTRA,G.P., HEUSER, V.D., BOEIRA, J.M. Occupational exposure of farm workers to pesticides: Biochemical parameters and evaluation of genotoxicity, **Environment International**, 2008.

REVAZOVA J, YURCHENKO V, KATOSOVA L, PLATONOVA V, SYCHEVA L, KHRIPACH L, INGEL F, TSUTSMAN T, ZHURKOV V. Cytogenetic investigation of women exposed to different levels of dioxins in Chapaevsk town, **Chemosphere**, v. 43; p. 999–1004, 2001.

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.

RIBEIRO, L. R., SALVADORI, M. F., MARQUES, E.K. **Mutagenesis Ambiental**, v. 356 p. 2003.

RITZ, B. and YU, F. Parkinson's disease mortality and pesticide exposure in California 1984–1994. **International Journal of Epidemiology**, v. 29, p. 323–329, 2000.

ROBERTS, W. C. A unique heart disease associated with a unique cancer: carcinoid heart disease. **Am J Cardiol**, v. 80, p. 6–251, 1997.

ROGERS, K.R. WANG, Y. Mulchandani, A. Mulchandani, P. Chen W. VER O TÍTULO DOS ARTIGOS. **Biotechnology Progress**, . v.15, n. 517, 1999.

ROMANO, R. M., ROMANO, M.A., MOURA, M.O., OLIVEIRA, C.A. A Exposição ao glifosato-Roundup causa atraso no início da puberdade em ratos machos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, , São Paulo, v. 45, n. 5, p. 481-487, 2008.

ROOS WP AND B. KAINA. DNA damage-induced cell death by apoptosis. **Trends in Molecular Medicine**, v.12, n. 9, p. 440-450, 2006.

ROSIN, M.P. GILBERT, A.M. Modulation of genotoxic effects in humans, in: M.L. Mendelsohn, R.J. Albertini Eds. , **Mutation and Environment, Part E: Environmental Genotoxicity, Risk, and Modulation**, **Wiley-Liss**, New York, p. 351–360, 1990.

ROSSNER, P. BOFFETA, P. CEPPI, M. BONASSI, S. SMERHOVSKY, Z. LANDA, K. JUZOVA, D. SRAM, R.J. Chromosomal aberrations in lymphocytes of healthy subjects and risk of cancer, **Environmental Health**, Perspect. v.113, p. 517–520, 2005.

RÜDIGER, H.W. Biomonitoring in occupational medicine. In: Marquart H, Schäfer SG, McClellan R, Welsch F (eds.). **Toxicology**. San Diego: Academic Press; p.1027-1039, 1999.

SAFFI, J., HENRIQUES, J.A.P. Reparação de DNA em células eucarióticas. In: **Genética Toxicológica**. Org. JULIANA DA SILVA, BERNARDO ERDTMANN, JOÃO ANTONIO PEGAS HENRIQUES, Porto Alegre: Editora: Alcance, p. 271-305, 2003.

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

SALVADORI, M. F., RIBEIRO, L.R., MARQUES, E.K. **Mutagenesis**. Ambiental, v. 356, p.163-170, 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 do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. Adolfo Lutz, v. 64, n. 1, p. 70-78, 2005.

SARAN, R; TIWARI, R. K.; REDDY, P. P.; AHUJA, Y. R. Risk assessment of oral cancer in patients with pré-cancerous states of the oral cavity using micronucleus test and hallenge assay. **Oral Oncology**, v. 44, p. 354-360, 2008.

SARTO F, FINOTTO S, GIACOMELLI L, MAZZOTTI D, TOMANIN R. AND LEVIS AG. The micronucleus assay in exfoliated cells of the human buccal mucosa. **Mutagenesis**, v. 2, p. 11-17, 1987.

SCHNEIDER, M., DIEMER, K., ENGELHART, K., ZANKL, H., TROMMER, W. E. AND BIESALSKI, H. K. Protective effects of vitamins C and E on the number of micronuclei in lymphocytes in smokers and their role in ascorbate free radical formation in plasma. **Free Radical Research**, v. 34, p. 209–219, 2001.

SCHOKET, B., PAPP, G., LE ´VAY, K., MRACKOVA, G., KADLUBAR, F. F. AND VINCZE, I. Impact of metabolic genotypes on levels of biomarkers of genotoxic exposure. **Mutation Research**, v. 482, p. 57–69, 2001.

SETLOW, R. B. Human cancer: etiologic agents/ dose responses / DNA repair/ cellular and animal models. **Mutation Research**, v. 477, p.1-4, 2001.

SHAHAM J, KAUFMAN Z, GURVICH R, LEVI Z. Frequency of sister-chromatid among greenhouse farmers exposed to pesticides. **Mutation Research**, v. 491, p. 71–80, 2001.

SAHDEO P., SMITA S., MADHULIKA S., AND YOGESHWER S.. Clastogenic Effects of Glyphosate in Bone Marrow Cells of Swiss Albino Mice. **Journal of Toxicology**, volume 2009, (2009).

SHUKLA, V. K., RASTOGI, A. N., ADUKIA, T. K., RAIZADA, R. B., REDDY, D. C. S. AND SINGH, S. Organochlorine pesticides in carcinoma of the gallbladder: a case-control study. **European Journal of Cancer Prevention**, v. 10, p. 153–156, 2001.

SILVA, J. ERDTMANN, B., HENRIQUES, J.A.P. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Editora: Alcance, v.1, p. 424, 2003.

SILVA, J. M da; NOVATO-SILVA, E; FARIA, H.P; PINHEIRO, T.M.M. Agrotóxico e trabalho: uma combinação perigosa para a saúde do trabalhador rural. **Revista de Ciência e Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 4, p. 891-903, 2005.

SILVA, J. M. Processo de trabalho e condições de exposição aos agrotóxicos: o caso dos horticultores de Baldim, Minas Gerais, Brasil. (**Dissertação**) **Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Engenharia**, Belo Horizonte, 2000.

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

SINGH, NP; MCCOY, M.T; TICE, R.R; and SCHNEIDER, E.L. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, p. 184–191, 1988.

SINGH, NP.,LAI, H. C. Methodes for freezing blood samples at. -80C for DNA damage analysis in human leukocytis. In the **Comet Assay in Toxicology**. RSC-Publishing, Cambridge, Edited by Dhawah Alok and Diana Anderson, 2009.

SINGH, R., SRAM, R. J., BINKOVA, B., KALINA, I., POPOV, T. A., GEORGIEVA, T., GARTE, S., TAIOLI, E. AND FARMER, P. B. The relationship between biomarkers of oxidative DNA damage, polycyclic aromatic hydrocarbon DNA adducts, antioxidant status and genetic susceptibility following exposure to environmental air pollution in humans. **Mutation Research**, v. 620, p. 83–92, 2007.

SINITOX. **Estatística anual de casos de intoxicação e envenenamento: Brasil – 2000**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003.

SINITOX - SISTEMA NACIONAL DE INFORMAÇÕES TÓXICO-FARMACOLÓGICA, Brasil. **Estatística anual de casos de intoxicação e envenenamento: Brasil – 2000**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2007.

SPEIT, G., WITTON-DAVIES, T., HEEPCANTREE, W., TRENZ, K. AND HOFFMANN, H. Investigations on the effect of cigarette smoking in the comet assay. **Mutation Research**, v. 542, p. 33–42, 2003.

SRAM RJ *et al.* Chromosomal aberrations in environmentally exposed population in relation to metabolic and DNA repair genes polymorphisms. **Mutation Research**, v. 620, p. 22–33, 2007.

STICH, H. F., CURTIS, J. R., PARIDA, B. B. Application of the micronucleus test to exfoliated cells of high cancer risk groups: tobacco chewers, **International Journal of Cancer**, v. 30, p. 553–559, 1982.

STICH, H.F., ROSIN, M.P., HORNBY, A.P., MATHEW, B., SANKARANARAYANAN, R., NAIR, M.K., Remission of oral leukoplakias and micronuclei in tobacco/betel quid chewers treated with beta-carotene and with beta-carotene plus vitamin A. **International Journal of Cancer**, v. 42, p. 195–199, 1998.

TERRADAS, M.M. MARTIN, L. TUSELL, A. GENESCA, DNA lesions sequestered in micronuclei induce a local defective-damage response, **DNA Repair (Amst.)** v. 8; p. 1225–1234, 2009.

THIER, T. BRUNING, P.H. ROOS, H.P. RIHS, K. GOLKA, Y. KO, H.M. BOLT, Markers of genetic susceptibility in human environmental hygiene and toxicology: the role of selected CYP, NAT and GST genes, **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 206, p.149–171, 2003.

THOMAS, P.; HECKER, J.; FAUNT, J.; FENECH, M.; Buccal micronucleus cytome biomarkers may be associated with Alzheimer's disease. **Mutagenesis**, vol. 22 no. 6 p. 371–379, 2007.

THOMPSON & THOMPSON. **Genetics in Medicine**. 5th ed WB Saunders, Philadelphia, 1991.

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. 25, p. 206-221, 2000.

TITLIC, M; JOSIPOVIC-JELIC, Z; PUNDA, A. Headache caused by pesticides – a review of the literature. **Acta Medica Croatica**; v.62, n. 2, p. 233-236, 2008.

TIZARD, I.R. **Imunologia Veterinária**. 6ª ed. Roca, São Paulo. p. 532, 2000.

TOLBERT, P.E., SHY, C.M. and ALLEN, J.W. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. **Mutation Research**, v. 271, p. 669–677, 1992.

TOLBERT, P.E., SHY, CM and ALEN, J.W. (1991). Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: a field test in snuff users. **American Journal of Epidemiology**, v.134, p. 840-850.

TOMEI,F., BIAGI,M., BACCOLO,T.P., TOMAO,E., GIUNTOLI,P. AND ROSATI,V.M. Liver damage among environmental disinfection workers. **The International Journal of Occupational and Environmental Health**,. Health, v. 40, p. 193–197, 1998.

TRAPÉ, A. Z. Exposição ocupacional a formulação contendo glifosato. **Revista Brasileira de Toxicologia**; v.18, n. 2, p. 114-116, 2005.

TRAVISI, C. M.; NIJKAM, P. P. Environmental and health risk in agriculture: a choice experiment approach to pesticides in Italy. **Ecological Economics**. V. 67: p. 598 – 607, 2008.

UMEGAKI, K. AND FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus assay in WIL2-NS cells: a sensitive system to detect chromosomal damage induced by reactive oxygen species and activated human neutrophils, **Mutagenesis**, v.15, p. 261–269.11, 2000.

UNDEGER, U., and BASARAN, N. Assessment of DNA damage in workers occupationally exposed to pesticides mixtures by the alkaline comet assay. **Genotoxicity**, v. 76, p. 430–436, 2002.

VALVERDE, M. e 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. 457-478, 2007.

VEIGA, M.M., DUARTE, F.J.C.M., MEIRELLES, L.A., GARRIGOU, A., BALDI, I. A contaminação por agrotóxicos e os Equipamentos de Proteção Individual (EPIs). **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional**, São Paulo, v. 32, n. 116, p.57-68, 2007.

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**, v. 419, p. 79-90, 1998.

VILLELA, I. V.; OLIVEIRA, I. M. de.; SILVA ,J. da.; HENRIQUES, J. A. P. DNA damage and repair in haemolymph cells of golden mussel (*Limnoperna fortunei*) exposed to environmental contaminants. **Mutation Research**, v. 605, p.78-86, 2006.

VILLELA, I.V., LAU, A., SILVEIRA, J., PRÁ, D., ROLLA, H.C., SILVEIRA, J.D. Bioensaios para o Monitoramento de Genotoxicidade Ambiental. In: Silva J.,

ERDTMANN B & HENRIQUES J. A.P. (organizadores) **Genética Toxicológica**. Ed. Alcance. Porto Alegre. p. 147-163, 2003.

WALLACH, JACQUES. **Interpretação de Exames Laboratoriais**. 7ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2003.

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Câncer. Folha n° 297. Fev 2006. Disponível em: [http:// www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/print.html](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/print.html). Acessado em: 21 de junho 2010 .

WYNAND, P.R. and BERND, K. DNA damage-induced cell death by apoptosis. **Trends in Molecular Medicine**. vol. 12, n. 9, 2006.

YÁÑEZ, L., BORJA-ABURTO,V.H., ROJAS, E., DE LA FUENTE, H., GONZÁLEZ-AMARO, H., GÓMEZ, H., JONGITUD, A.A., and DÍAZ-BARRIGA, F.. DDT induces DNA damage in blood cells. Studies in vitro and in women chronically exposed to this insecticide, **Environmental Research**, v. 94, p. 18–24, 2004.

ZALATA, A., YAHIA, S., EL-BAKARY, A. and ELSHEIKHA, H. M. Increased DNA damage in children caused by passive smoking as assessed by comet assay and oxidative stress. **Mutation Research**, v. 629, p. 140–147, 2007.

ZELJEZIC, D., GARAJ-VRHOVAC. Chromosomal aberration and single cell gel electrophoresis (Comet) assay in the longitudinal exposure to pesticides. **Mutagenesis**, v. 16, n. 4, p. 359-363, 2001.

ZELJEZIC, D; VRDOLJAK, A.L; RADIC, B; FUCHS,N; BEREND, S; ORESCANIN, V; KOPJAR, N. Comparative evaluation of acetylcholinesterase status and genome damage in blood cells of industrial workers exposed to carbofuran. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, p. 2488–2498, 2007.

ZHENG T, ZAHM SH, CANTOR KP, WEISENBURGER DD, ZHANG Y, BLAIR A. Agricultural exposure to carbamate pesticides and risk of non-Hodgkin lymphoma. **Journal of Occupational & Environmental Medicine**; v. 43, p. 641-649, 2001.

ZHOU, Q., TALASKA, G., JAEGER, M. *et al.* Benzdine-DNA adduct levels in human peripheral white blood cells significantly correlate with levels in exfoliated urothelial cells. **Mutation Research**, v. 393, p. 199–205, 1997.

APÊNDICE A- FOTOS DA REALIZAÇÃO DA PESQUISA DE CAMPO

Palestra



Palestra



Entrevista



Coleta de Sangue

APÊNDICE A - FOTOS DA REALIZAÇÃO DA PESQUISA DE CAMPO (cont.)**Coleta de Sangue****Coleta de Mucosa Bucal****Modo de Trabalho**

ANEXO A- CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ.

Universidade Federal do Ceará
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. N° 607/08 Fortaleza, 26 de setembro de 2008
Protocolo COMEPE n° 174/ 08
Pesquisador responsável: Tatiana Vieira Souza Chaves
Dept°./Serviço: Laboratório Central de Saúde Pública/ LACEN/ Piauí
Título do Projeto: "Estudo de possíveis alterações genéticas induzidas por agrotóxicos em agricultores do Estado do Piauí"

Levamos ao conhecimento de V.S^a. que o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará – COMEPE, dentro das normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos, do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde, Resolução n° 196 de 10 de outubro de 1996 e complementares, aprovou o projeto supracitado na reunião do dia 25 de setembro de 2008.

Outrossim, informamos, que o pesquisador deverá se comprometer a enviar o relatório final do referido projeto.

Atenciosamente,

Dra. Mirian Parente Monteiro
Coordenadora Adjunta do Comitê
de Ética em Pesquisa
COMEPE/UFC

ANEXO B- QUESTIONÁRIO DE SAÚDE PESSOAL APLICADO A TRABALHADORES EXPOSTOS E NÃO EXPOSTOS AOS AGROTÓXICOS

(De acordo com modelo recomendado por: *International Commission for Protection against Environmental Mutagens and Carcinogens (ICPEMC) Mutation Research, 204:379406, 1988*)

Este questionário, assim como o estudo a ele relacionado, deve ser de seu interesse. A participação é espontânea e constará destas informações gerais sobre saúde e dieta, mais uma coleta de sangue para estudo citogenético. O estudo consiste em uma avaliação de mutações nos cromossomos de cada participante. Mutações cromossômicas ocorrem normalmente nas células de todas as pessoas em nível bastante baixo, e são apontadas, entre outros efeitos, nos processos de envelhecimento e do câncer. Trabalhadores em atividades de risco (por exemplo, radiologia, quimioterapia, uso de óxido de etileno e outras), se não seguirem normas adequadas de segurança, podem aumentar a frequência de mutações cromossômicas em suas células. Este estudo poderá servir como sinal de alerta para prevenir e melhorar as condições de segurança. Caso não se encontrem diferenças entre trabalhadores de atividades de risco e outros de atividades diversas, poderemos concluir que os itens de segurança são efetivos neste aspecto. Isto servirá de estímulo para continuar tomando cuidados com a vida no local de trabalho.

Leia e responda cuidadosamente as seguintes questões. A informação dada por você não será associada com o seu nome, sendo conhecida apenas pelos pesquisadores associados a este estudo. As respostas deste questionário poderão ter influência direta na interpretação de nossos resultados. Por isso, contamos com sua cooperação em fornecer informações corretas.

Obrigado pelo seu interesse.

1. Nome _____

Data: _____

Código n Para ser preenchido pelo pesquisador

Essa folha será destacada das demais do questionário e arquivada. Apenas o número do código será usado como identificação nas próximas páginas. Se espaços adicionais forem necessários para completar uma resposta, por favor escreva atrás da página e identifique o complemento da resposta com o número da questão.

HISTÓRIA PESSOAL

Data de hoje: _____.

Qual a sua idade? _____(em anos). Sexo: () Masculino () Feminino

A qual grupo étnico você pertence:

() Caucasiano () Negro () Chinês () Japonês

() Outro. Qual? _____.

Qual o seu estado civil?

() Casado () Solteiro () Separado () Divorciado () Viúvo

De quantos filhos você é pai natural (isto é, não inclua filhos adotados e de criação, e inclua filhos que moram separadamente)? _____

HISTÓRIA OCUPACIONAL

Qual o seu local de trabalho ? _____.

Há quanto tempo você trabalha neste local? _____.

Se há menos de dez anos, onde você trabalhou previamente e por quanto tempo?

_____.

Que tipo de trabalho você faz? _____

EXPOSIÇÃO

Liste os agentes químicos (por exemplo, gases tóxicos, benzeno, chumbo, fármacos, agrotóxicos, etc.) ou físicos (radiação) a que você se expôs nos últimos 10 anos em seu trabalho.

Nos últimos 12 meses:

Quantas vezes por mês:

Nos últimos 10 anos:

Quantas vezes por mês:

Liste os agentes químicos (agrotóxicos e outros que julgar necessário) ou físicos a que você se expôs nos últimos 10 anos fora de seu trabalho.

Nos últimos 12 meses:

Quantas vezes por mês:

Nos últimos 10 anos:

Quantas vezes por mês:

HISTÓRIA DE FUMO

Alguma vez você fumou? ()Sim ()Não

Se sim, continue: a) Quanto tempo você fumou? _____(em anos)

b) Você fuma atualmente? ()Sim ()Não

Se sim, passe para a c)

Se não: Quando você parou de fumar? _____(mês e ano).

c) Você fuma cigarros? ()Sim ()Não

Se sim, quantas carteiras por dia?

()Menos de ½ carteira

()½ a 1 carteira

()Mais de 1 carteira, quantas? _____

Você fuma cigarros com filtro? ()Sim ()Não

Qual a sua marca usual? _____ .

d) Você fuma charutos? ()Sim ()Não

Se sim, quantos charutos por dia? ()1 charuto

()2 a 3 charutos

()4 ou mais charutos. Quantos? _____

e) Você fuma cachimbo? ()Sim ()Não

Se sim, quantas vezes por dia? ()1 vez

()2 a 3 vezes

()4 ou mais vezes. Quantas? _____

f) O que você fumava no passado? ()Cigarros

()Charutos

()Cachimbo

g) Você mastiga tabaco? ()Sim ()Não

MEDICAMENTOS E DOENÇAS

Você tem tomado algum medicamento prescrito pelo médico no último ano (por exemplo, comprimidos para pressão, insulina, tranquilizantes, relaxantes musculares, etc.)?

()Sim ()Não

Se sim, por favor indique:

Per íodo .Tipo de medicamento: Dose: Quantos por dia: Início(mês): Término(mês):

Você tem tomado algum medicamento não prescrito por médico no último ano (por exemplo, aspirina, antiácidos, antihistaminas, sedativos ou outras drogas)?

()Sim ()Não

Se sim, por favor indique:

Período : Tipo de medicamento: Dose: Quantos por dia: Início(mês): Término(mês):

Você toma ou tomou alguma vitamina nos últimos 6 meses?

()Sim ()Não

Se sim, por favor indique:Tipo de vitamina: Dose: Quantas vezes por semana:

a)Você teve ou tem alguma dessas doenças?

Câncer ()Sim ()Não

Hepatite ()Sim ()Não

Mononucleose ()Sim ()Não

Herpes ()Sim ()Não

AIDS ()Sim ()Não

Meningite ()Sim ()Não

Infecção bacteriana ou viral ()Sim ()Não

Doença cardiovascular ()Sim ()Não

Diabete ()Sim ()Não

Outras doenças importantes ()Sim ()Não

b)Se sim, indique abaixo: Doença: Per íodo da doença: Tr atamento:

c)Liste as vacinações que você recebeu nos últimos 12 meses.

Vacina: Data:_____

d)Liste os raiosX diagnósticos e terapêuticos, recebidos nos últimos 10 anos.

Razão par a o r aioX Data(ano)

e)Você fez alguma cirurgia durante o último ano?

Data: Razão:_____

f)Dê as datas de quando você teve febre nos últimos 12 meses.

Data(mês): Doença associada: Medicamento tomado:

DIETAS

(deve refletir apenas os hábitos frequentes)

Você come apenas vegetais? ()Sim ()Não

Você come carne? ()Sim ()Não

a)Se sim, com que frequência você come o seguinte:

Dias por semana : 1 a 2;3 a 4; 5 a 6 todos dias

Carne bovina _____

Peixe _____

Galinha _____

Porco _____

Outras _____

b)Como você prefere sua carne? ()Mal passada ()No ponto ()Bem passada

Você usa adoçantes? ()Sim ()Não Quantos por dia? _____

Você bebe refrigerantes? ()Sim ()Não Quantos por dia? _____

Comente sobre sua dieta, caso ela tenha algo de especial (por exemplo, dieta rica em proteínas e pobre em carboidratos,etc).

Você bebe café? ()Sim ()Não Quantos xícaras pequenas por dia? _____

Você bebe chá? ()Sim ()Não Quantos xícaras por dia? _____

Você toma chimarrão? ()Sim ()Não Com que frequência? _____

Você bebe cerveja? ()Sim ()Não Se sim, por favor indique sua média de consumo semanal:

()1-6 garrafas por semana ou menos.

()7-12 garrafas por semana.

()13-24 garrafas por semana.

()Mais de 24 garrafas por semana. Quantas? _____ .

Você bebe vinho? ()Sim ()Não Se sim, por favor indique sua média de consumo semanal:

()1-4 copos por semana ou mais.

()5-8 copos por semana.

()9-16 copos por semana.

()Mais de 16 copos por semana. Quantos? _____ .

Você bebe outras bebidas alcoólicas (excluindo cerveja e vinho)?

()Sim ()Não Se sim, qual ou quais? _____

Por favor, indique sua média de consumo semanal:

()1-4 copos por semana ou menos.

()5-8 copos por semana.

()9-16 copos por semana.

()Mais de 16 copos por semana. Quantos? _____ .

HISTÓRIA GENÉTICA

Você tem conhecimento de algum defeito de nascimento ou outra desordem genética ou doença hereditária que tenha afetado seus pais, irmãos, irmãs ou seus filhos?

Sim Não Se sim, por favor especifique: _____

Você ou a sua esposa teve ou tem dificuldade para engravidar?

Sim Não Se sim, por favor especifique: _____

Você já teve um filho que tenha nascido prematuramente ou que tenha sido abortado?

Sim Não

Você tem um gêmeo idêntico vivo? Sim Não

ANEXO C - VALORES DE REFERÊNCIA UTILIZADOS PARA ANÁLISE HEMATOLÓGICA.

ERITROGRAMA	VALORES DE REFERÊNCIA	
Hemácias mm ³	Homem: 4,5 – 6,5	
	Mulher: 3,9 – 5,8	
Hemoglobina em g/dL	Homem: 13,5 – 18,0	
	Mulher: 11,5 – 16,4	
Hematócrito %	Homem: 40,0 – 54,0	
	Mulher: 36,0 – 47,0	
Volume Globular Média em u ³	76,0 – 96,0	
Hemoglobina Corpuscular Média g%	27,0 – 32,0	
Concentração da Hemoglobina Globular Média %	32,0 – 36,0	
Leucograma		
Leucócitos por mm ³	Adultos: 5.000 – 10.000	
	04 a 07 Anos: 6.000 – 15.000	
	08 a 12 Anos: 4.500 – 13.000	
	%	mm ³
Neutrófilos	40 – 75	2.500 – 7.500
Promielócitos	0	-
Mielócitos	0	-
Metamielócitos	0 – 1	-
Bastões	1 – 3	45 – 330
Segmentados	40 – 75	-
Eosinófilos	1 – 6	40 – 330
Basófilos	0 – 1	1 – 100
Linfócitos	20 – 45	1.500 – 3.500
Monócitos	02 – 10	200 – 800
Plaquetas	150.000 a 400.000 /mm ³	

Fonte : LACEN, 2010

ANEXO D - VALORES DE REFERÊNCIA UTILIZADOS PARA ANÁLISE BIOQUÍMICA

DOSAGENS BIOQUÍMICAS	VALORES DE REFERÊNCIA
Uréia	10 mg/dL a 45 mg/ dL
Creatinina	0,4 mg/ dL a 1,3 mg/ dL
Proteínas totais	6,0 a 8,0 g/dL
Albumina	3,5 a 5,5 g/dL
Transaminase oxalacética – TGO	4 U/mL a 36 U/mL
Transaminase piruvica – TGP	4 U/mL a 32 U/mL
Gama GT	Homem: 07 a 40 U/L
	Mulher: 05 a 27 U/L
Fosfatase alcalina (ALP)	Adulto: 13 a 43 U/L
	Criança até 12 Anos: 56 a 156 U/L
BChE	Homem: 3.930 a 10.000 U/l
	Mulher: 4.620 a 11.500 U/l

Fonte: LACEN, 2010

ANEXO E: FICHAS DE AVALIAÇÃO DOS TESTES GENOTÓXICOS E MUTAGÊNICOS



SECRETARIA DE SAUDE DO ESTADO DO PIAUI
 LABORATORIO CENTRAL DE SAÚDE PUBLICA - LACEN
 "Dr. COSTA ALVARENGA."



Laboratório de Toxicologia Genética Molecular (LABTOXGEN-MOL)

FICHA DE AVALIAÇÃO DE FREQUÊNCIA DE ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS

Projeto: _____ Data: ___/___/_____ Responsável: _____

PACIENTES	CAMPO	Nº CÉLULAS	Nº DE METÁFASES	% METÁFASE	ABERRAÇÕES CROMATÍDICAS	ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS					TOTAL DE AC	% DE AC	
						Dicêntricos	Tricêntricos	Anel Acêntrico	Fragmentos	DELEÇÕES			
										Terminais			Intersticiais

Índice Metafásico (IM) = $\frac{\text{Nº de Metáfases}}{300} \times 100$

% AC = $\frac{\text{Total de AC}}{300} \times 100$



SECRETARIA DE SAÚDE DO ESTADO DO PIAUÍ
LABORATORIO CENTRAL DE SAÚDE PÚBLICA - LACEN
"Dr. COSTA ALVARENGA."



Laboratório de Toxicologia Genética Molecular (LABTOXGEN-MOL)
FICHA DE AVALIAÇÃO DO TESTE COMETA

Projeto Material Biológico:

Grupo:

Pacientes Não Expostos

Pacientes Expostos

CÉLULA	CLASSE	CÉLULA	CLASSE
1.		26.	
2.		27.	
3.		28.	
4.		29.	
5.		30.	
6.		31.	
7.		32.	
8.		33.	
9.		34.	
10.		35.	
11.		36.	
12.		37.	
13.		38.	
14.		39.	
15.		40.	
16.		41.	
17.		42.	
18.		43.	
19.		44.	
20.		45.	
21.		46.	
22.		47.	
23.		48.	
24.		49.	
25.		50.	

CÁLCULO DO ÍNDICE DE DANO		
DANOS	TOTAL DE CÉLULAS X CLASSE DE DANOS	TOTAL DE DANOS
0	_____ X 0	
1	_____ X 1	
2	_____ X 2	
3	_____ X 3	
4	_____ X 4	
ID (%)		DANOS

CÁLCULO DA FREQUÊNCIA DE DANOS (FD - %)
FD = 100 – Total de Danos 0 FD= _____

