



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

IVO GABRIEL DA FROTA FRANÇA

**PAPEL DAS POLIMERASES TLS COMO BIOMARCADORES DE EFEITO
FRENTE A EXPOSIÇÃO CRÔNICA DE AGRICULTORES Á PESTICIDAS. HÁ
EVIDÊNCIAS NAS SINDROMES MIELODISPLÁSICAS?**

FORTALEZA

2020

IVO GABRIEL DA FROTA FRANÇA

PAPEL DAS POLIMERASES TLS COMO BIOMARCADORES DE EFEITO FRENTE A
EXPOSIÇÃO CRÔNICA DE AGRICULTORES Á PESTICIDAS. HÁ EVIDÊNCIA NA
SINDROME MIELODISPLÁSICA?

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Acadêmico em Ciências Médicas, do Departamento de Medicina Clínica, da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção de título de Mestre em Ciências Médicas

Orientador: Prof. Dr. Ronald Feitosa Pinheiro

FORTALEZA

2020

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

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

França, Ivo Gabriel da Frota.

PAPEL DAS POLIMERASES TLS COMO BIOMARCADORES DE EFEITO FRENTA A
EXPOSIÇÃO CRÔNICA DE AGRICULTORES À PESTICIDAS / Ivo Gabriel da Frota França. – 2020.
86 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-
Graduação em Ciências Médicas, Fortaleza, 2020.
Orientação: Prof. Dr. Ronald Feitosa Pinheiro.

1. Biomarcadores. 2. Agrotóxicos. 3. DNA Polimerases TLS. I. Título.

CDD 610

Dedico este trabalho as três pessoas mais importantes da minha vida: minha mãe, Suzana; minha irmã, Glória e minha companheira, Camila.

AGRADECIMENTOS

Dentre as idas e vindas em relação as minhas crenças, sei que uma força maior que está acima de nós esteve me guiando durante toda a minha vida e especialmente neste processo. Agradeço a **Deus** por ter colocado pessoas incríveis ao longo da minha vida, não poderia ser mais grato.

Á minha mãe, **Suzana**. Uma pessoa que nutro um amor incondicional, que nunca vou conseguir transpassar este sentimento em palavras ou ações, sempre vai parecer pouco. Obrigado, mãe, por ter me ajudado em todos os momentos, por ter me dado forças, por ser um exemplo de uma pessoa de caráter, honesta, batalhadora, dentre tantos outros atributos. Sei o quanto abdicou de seus sonhos por mim e minha irmã, só nós dois sabemos o que passamos até este momento, sendo que estou aqui hoje é graças a senhora. Ainda irei recompensa-la por tudo. Sua felicidade é minha felicidade. Te amo mãe.

Á minha irmã, **Glória**, por ter passado comigo os melhores e piores momentos das nossas vidas. Por estar sempre ao meu lado e da nossa mãe. Te amo.

Agradeço imensamente a minha família, minha vó, **Maria Helena**, minha tia **Vicentina** e prima **Priscilla**, pela cumplicidade e torcida em todos os momentos. Por estarem presentes na minha vida desde os primeiros momentos e por influenciarem na pessoa que me tornei.

Á **Adelânia** e família, por terem me acolhido tão bem desde o primeiro dia, por fazer da casa de vocês um canto onde eu sinta paz. Um lar onde as horas passam voando, por eu me sentir tão bem ao lado de vocês, sendo um modelo para mim quando eu formar a minha família. Obrigado por todo o amor dado a mim. Sem vocês, todo o caminho teria sido muito mais difícil.

A minha companheira **Camila**, por ser essa pessoa incrível que me surpreende a cada dia. Agradeço todo dia por você ter entrado na minha vida. Obrigado por todo o amor e paciência durante este processo. Eu tenho a plena convicção que não teria conseguido sem você. Agradeço pelas palavras certas nos momentos certos, por aparecer aqui em casa quando eu achava que tudo estava perdido. Nunca tinha imaginado em casar ou formar uma família até conhecer você. Obrigado por cada dia me mostrar coisas novas e me tornar uma pessoa melhor. Te amo!

Á todos os componentes do Laboratório de Citogenômica do Câncer, onde tive o prazer fazer parte deste grupo por mais de 3 anos. Obrigado, **Mayara, Manu, Sharlene, Gabi, Victor, Marília, Izabelle, Cris, Gustavo, Letícia, Breno**. Muito obrigado pelo companheirismo durante todos esses anos. Um local onde passei um dos melhores momentos da minha vida graças a vocês!

Agradeço especialmente a minha amiga, **Roberta**, por todo o apoio desde que entrei no laboratório. Dentre tantas dificuldades que enfrentou ao longo da vida, fico extremamente feliz pelo caminho que está galgando e colhendo os frutos de todo seu esforço. Uma profissional exemplar e uma pesquisadora ímpar. Tudo o que se propõem a fazer, faz da melhor forma e com maestria. Obrigado Roberta, por todo apoio dado a mim durante este processo, pela ajuda de forma quase incondicional. Apesar de estar saindo do laboratório, sei que nossa amizade irá perdurar.

Agradeço a minha companheira de profissão, **Dani**, pela amizade construída ao longo deste três anos. Pelo senso de honestidade, dedicação e imenso caráter que levo como exemplo para a

vida. Por sempre falar as coisas certas no momentos mais oportunos. Sou extremamente grato pela imensa ajuda durante este processo. Tenho você como exemplo de profissional e ser humano.

Ao meu melhor amigo e irmão **Wesley**, pela amizade construída desde os tempos da faculdade, onde foi sendo fortalecida a cada ano. Por sempre estar ao meu lado em todos os momentos. Apesar de todas as intempéries e adversidades da vida, vejo você prosperando cada vez mais e sei o quanto é merecedor de tudo o que já conquistou até hoje. Tenho como exemplo de perseverança e garra. Obrigado meu irmão por todos os momentos de alegrias e tristezas compartilhados, foram nestes momentos que nós crescemos.

Ao meu orientador, **Prof. Ronald Feitosa**, por ter me dado a oportunidade de participar do seu laboratório há 3 anos e meio. Um local onde amadureci com erros e acertos durante esta jornada. Sou grato pelos momentos de ensino que me proporcionou, pelas quartas-feiras no ambulatório, onde tive a oportunidade de conhecer um outro lado da doença, além de tomar conhecimento do belo trabalho que é desenvolvido no laboratório. Desejo cada vez mais sucesso ao senhor e todos os alunos que compõem o laboratório. Um local onde guardarei belas lembranças. Os meus mais sinceros agradecimentos, Prof. Ronald.

Ao **Howard** e **Maria Júlia**, por terem aceitado avaliar este trabalho e feito considerações cruciais para o melhoramento deste estudo.

À **Universidade Federal do Ceará**, pela oportunidade de fazer o Mestrado

RESUMO

O câncer abrange um grupo de diversas doenças cujo principal característica é o crescimento descontrolado e a proliferação de células anormais no organismo. Os biomarcadores são ferramentas que surgem como auxílio na previsão da causa e progressão de várias doenças. Os cânceres podem ser desencadeados por alterações genéticas, epigenéticas e/ou imunológicas. Estas modificações genéticas podem ser causadas por agentes endógenos ou exposição a agentes exógenos, como tabagismo, radiação ultravioleta e contato com pesticidas. Como resposta a esta exposição, nosso organismo desenvolveu, ao longo da evolução, diversas proteínas especializadas no processo de reparo do DNA que atuam em lesões de fita simples e de fita dupla, além de enzimas responsáveis por tolerar estes danos, quando essas lesões são refratárias. A tolerância aos danos no DNA é realizada pela DNA polimerases com atividade translesão (TLS), enzimas que apresentam a habilidade de transpassar as lesões ou corrigir o DNA lesionado. Devido à baixa fidelidade de incorporação de nucleotídeos pelas TLS, podem ocorrer quadros de mutações, levando a instabilidade genômica. O objetivo deste estudo foi avaliar a expressão gênica das enzimas DNA polimerases com atividade TLS (*POLH*, *POLL*, *REV3L*, *PCNA*, *POLI*, *REVI*, *POLN*, *POLQ* e *POLK*) em indivíduos expostos a agrotóxicos, comparando com grupos de pacientes portadores de Síndrome Mielodisplásica (SMD) e controles saudáveis, utilizando a metodologia de PCR em tempo real (RT-qPCR). Foram avaliados 86 pacientes com SMD diagnosticados em hospital terciário de referência, 54 trabalhadores agrícolas da região de Limoeiro do Norte-CE e 6 controles saudáveis. Identificamos que entre os grupos dos agricultores, o grupo grande produtor apresentou um aumento de expressão dos genes *POLK* e *POLL* em relação ao grupo da agricultura familiar. Em relação ao cariótipo, foi observado um aumento dos níveis de expressão dos genes *REV3L*, *POLQ* e *POLK* nos agricultores que apresentavam cariótipo alterado. Em relação a análise entre os grupos SMD, agricultores e controles saudáveis, houve um aumento dos níveis de expressão dos genes *REVI*, *POLH*, *POLK*, *POLL* e *PCNA* do grupo de SMD em relação aos agricultores e controles saudáveis. Houve um aumento dos níveis de expressão dos genes *REV3L*, *POLI* e *POLQ* no grupo SMD em relação aos agricultores. Esta pesquisa demonstrou que o aumento da expressão dos genes *REV3L*, *POLQ* e *POLK* entre os agricultores que apresentavam cariótipo alterado pode estar associado a um aumento da instabilidade genômica como resultado da exposição crônica aos pesticidas. Em relação aos grupos, observamos um aumento dos níveis de expressões dos genes *POLH*, *POLL*, *REV3L*, *PCNA*, *POLI*, *REVI*, *POLQ* e *POLK* no grupo SMD frente aos agricultores e controles saudáveis, podendo estar associados aos mecanismos biológicos da doença.

Palavras-chave: Biomarcadores, Agrotóxicos, DNA Polimerases, TLS

ABSTRACT

Cancer comprises a group of several diseases whose main characteristic is the uncontrolled growth and proliferation of abnormal cells. Biomarkers are tools that help predict cause and progress of various diseases. Cancers can be triggered by genetic, epigenetic and/or immunological alterations. These genetic modifications can be caused by endogenous agents or exposure to exogenous agents, such as smoking, ultraviolet radiation, and contact with pesticides. As a response to this exposure, our body has developed, throughout evolution, several proteins specialized in the DNA repair process that acts on single-stranded and double-stranded lesions, in addition to enzymes responsible for tolerating these damages, when these lesions are refractory. Tolerance to DNA damage is achieved by DNA polymerases with translesion activity (TLS), enzymes with the ability to pass through lesions or correct damaged DNA. Due to the low fidelity of nucleotide incorporation by TLS, mutations can occur, leading to genomic instability. The aim of this study was to evaluate the gene expression of DNA polymerase enzymes with TLS activity (*POLH*, *POLL*, *REV3L*, *PCNA*, *POLI*, *REVI*, *POLN*, *POLQ*, and *POLK*) in individuals exposed to pesticides, comparing with groups of patients with Myelodysplastic syndrome (MDS) and healthy controls, using the real-time PCR methodology (RT-qPCR). 86 patients diagnosed with MDS in a tertiary referral hospital, 54 agricultural workers of Limoeiro do Norte-CE and 6 healthy controls were evaluated. We found that among the groups of farmers, the large producer group showed increased expression of *POLK* and *POLL* genes in relation to the family farming group. Regarding the karyotype, an increase in the levels of expression of *REV3L*, *POLQ*, and *POLK* was observed in farmers who presented altered karyotype. Regarding the analysis between MDS groups, farmers and healthy controls, there was an increase in the expression levels of *REVI*, *POLH*, *POLK*, *POLL* and *PCNA* in MDS group compared to healthy farmers and controls. There was an increase in the levels of expression of *REV3L*, *POLI*, and *POLQ* in MDS group in relation to farmers. This research demonstrated an association between the increased expression of *REV3L*, *POLQ*, and *POLK* among farmers with altered karyotype may be associated with a higher genomic instability as a result of chronic exposure to pesticides. Regarding the groups, we observed an increase in expression levels of *POLH*, *POLL*, *REV3L*, *PCNA*, *POLI*, *REVI*, *POLQ*, and *POLK* in MDS compared to farmers and healthy controls, which may be associated with the biological mechanisms of the disease.

Keywords: Biomarkers, Pesticides, DNA Polymerases, TLS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama esquemático da ação de um biomarcador

Figura 2. Mecanismos de reparo em lesões de fita dupla no DNA.

Figura 3. DNA polimerase (λ) participa nas vias por BER e NHEJ.

Figura 4. Atuação das polimerases TLS em cenário de danos ao DNA.

Figura 5. Distribuição da quantidade do ingrediente ativo glifosato no Brasil (2009-2017).

Figura 6. Nível de expressão dos genes *POLK* e *POLL* nos grupos grande produtor e agricultura familiar.

Figura 7. Nível de expressão dos gene *POLL* em relação ao cariótipo.

Figura 8. Nível de expressão gênica das DNA polimerases TLS *POLH*, *POLK*, *POLL*, *REVI* e PCNA nos grupos SMD, Grande Produtor, Agricultura Familiar e Controle

Figura 9. Nível de expressão gênica das DNA polimerases TLS *REV3L*, *POLI* e *POLQ* nos grupos SMD, Grande Produtor e Agricultura Familiar.

Figura 10. Esquema de caracterização dos principais resultados de expressão avaliados nesse estudo

Figura 11. Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes *REV3L* e *POLH* nos casos de SMD, agricultores e controles.

Figura 12. Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes *REV3L* e *POLK* nos casos de SMD, agricultores e controles.

Figura 13. Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes *REV3L* e *REVI* nos casos de SMD, agricultores e controles.

Figura 14. Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes *REV3L* e *PCNA* nos casos de SMD, agricultores e controles.

Figura 15. Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes *REV3L* e *POLQ* nos casos de SMD, agricultores e controles.

Figura 16. Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes *POLK* e *POLQ* nos casos de SMD, agricultores e controles.

Figura 17. Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes *PCNA* e *POLQ* nos casos de SMD, agricultores e controles.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Principais tipos de biomarcadores e suas funções.
- Tabela 2.** Impacto Prognóstico das mutações mais recorrentes na SMD
- Tabela 3.** Taxa de consumo de agrotóxicos e áreas plantadas – Ceará (20007-2012)
- Tabela 4.** Estratificação do grupo de risco
- Tabela 5.** Sondas alvos utilizadas na reação de RT-qPCR
- Tabela 6.** Sondas dos endógenos utilizadas na reação de RT-qPCR
- Tabela 7.** Características gerais do três grupos
- Tabela 8.** Características dos trabalhadores rurais dos dois grupos avaliados no estudo
- Tabela 9.** Características relacionadas ao manejo dos agrotóxicos
- Tabela 10.** Descrição sociodemográfica, laboratorial e de exposição dos agricultores incluídos no estudo

LISTA DE ABREVIATURAS

altEJ	<i>alternative end-joining</i>
B2M	<i>β2-microglobulina</i>
cDNA	<i>DNA complementar</i>
CQ	<i>Quantification cycle</i>
CTD	<i>Domínio carboxi-terminal</i>
dNTP	<i>Desoxirribonucleotídeo trifosfato</i>
dCMP	<i>Monofosfato de desoxicitidina</i>
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
EPSPS	<i>5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato sintetase</i>
FISH	<i>Hibridização in situ por fluorescência</i>
FRAF6	<i>Sítio frágil localizado no cromossomo 6</i>
GAPDH	<i>Gliceraldeído fosfato desidrogenase</i>
HR	<i>Homologous recombination</i>
IARC	<i>International Agency Research Classification</i>
KCl	<i>Cloreto de potássio</i>
LMA	<i>Leucemia mieloide aguda</i>
MO	<i>Medula óssea</i>
mRNA	<i>RNA mensageiro</i>
NHEJ	<i>Non-homologous end joining</i>
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
OMS	<i>Organização Mundial da Saúde</i>
OFs	<i>Organofosforados</i>
PCR	<i>Reação em cadeia da polimerase</i>
PCNA	<i>Antígeno nuclear de proliferação celular</i>

POLH	<i>DNA polymerase eta</i>
POLI	<i>DNA polymerase iota</i>
POLK	<i>DNA polymerase kappa</i>
POLL	<i>DNA polymerase lambda</i>
POLN	<i>DNA polymerase nu</i>
POLQ	<i>DNA polymerase theta</i>
qPCR-RT	<i>Reação em cadeia da polimerase em tempo real</i>
REV1	<i>DNA directed polymerase</i>
REV3L	<i>DNA directed polymerase zeta catalytic subunit</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
SERR	<i>Surveillance, epidemiology and end Results</i>
SF3B1	<i>Splicing factor 3b subunit 1</i>
SMD	<i>Síndrome mielodisplásica</i>
TLS	<i>Translesão</i>
TCLE	<i>Termo de Consentimento Livre e Esclarecido</i>
UBC	<i>Ubiquitina C</i>
UV	<i>Ultravioleta</i>

SUMÁRIO

1 . INTRODUÇÃO	16
1.1 Aspectos gerais sobre o câncer.....	16
1.2 Biomarcadores	16
1.3 Tipos de Biomarcadores.....	17
1.5 Fatores de risco para o câncer	19
1.5.1 Tabagismo	19
1.5.2 Radiação Ultravioleta.....	20
1.5.3 Idade.....	20
1.6 Patogênese da Síndrome Mielodisplásica	21
1.6 Mecanismos de respostas aos danos no DNA.....	22
1.7 DNA Polimerases com atividade translesão (TLS).....	23
1.7.1 Família de DNA polimerases A: Polimerase TLS theta (θ) e nu (ν).....	24
1.7.2 Família B de DNA Polimerases: TLS Polimerase zeta (ζ).....	26
1.7.3 Família X: TLS polimerase lambda (λ).....	27
1.7.4 Família Y: Rev1 e polimerases eta (η), kappa (κ) e iota (ι)	28
2. Agrotóxicos.....	31
2.1 Aspectos Gerais dos Agrotóxicos	31
2.2 Agrotóxicos no Ceará.....	31
2.3 Organofosforados	32
2.4 Glifosato.....	33
2.5 Agrotóxicos e polimerases TLS como possíveis biomarcadores para SMD.....	35
3 . OBJETIVOS	37
Objetivo Geral.....	37
Objetivos Específicos.....	37
4. METODOLOGIA	38
4.1 Casuística	38
4.2 Aspectos éticos.....	38
4.3 Cariótipo por Banda G	39

3.4 Análise da Expressão do mRNA por RT-qPCR.....	39
3.4.1 Obtenção de amostras da medula óssea	39
3.4.2 Extração de RNA Total	40
3.4.3 Síntese de cDNA	40
3.4.4 RT-qPCR (PCR quantitativa em tempo real).....	41
3.4.5 Definição dos genes endógenos utilizados nas análises dos dados de RT-qPCR	42
3.4.6 – Validação da qualidade e estabilidade no nível de expressão das amostras de cDNA avaliadas.....	43
3.5 Variáveis analisadas	44
4.5 Análises Estatísticas	44
5. RESULTADOS	46
5.1 Caracterização dos grupos.....	46
5.2 Caracterização dos agricultores.....	46
5.3 Análise do nível de expressão gênica por RT-qPCR em amostras de medula óssea dos agricultores.....	52
5.3.1 Expressão gênica das Polimerase TLS entre grande produtor e agricultura familiar.....	52
5.3.2 Expressão gênica das Polimerase TLS nos grupos grande produtor e agricultura familiar em relação ao cariótipo.....	53
5.4 Análise do nível de expressão gênica por RT-qPCR em amostras de medula óssea dos pacientes com SMD, agricultores e controles saudáveis	54
5.4.1 Expressão gênica das Polimerase TLS em pacientes diagnosticados com SMD, agricultores e controles saudáveis.....	54
5.4.2 Expressão gênica das Polimerase TLS em pacientes diagnosticados com SMD e agricultores	57
6. DISCUSSÃO	66
7. CONCLUSÕES	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
APÊNDICE A	84
Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)	84
APÊNDICE B	Error! Bookmark not defined.
Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)	Error! Bookmark not defined.

1 . INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais sobre o câncer

O câncer é um termo amplamente utilizado que abrange mais de 200 doenças distintas, cujo principal característica é o crescimento descontrolado e a proliferação de células anormais. Devido a sua enorme variedade, os cânceres diferem de forma bastante significativa em relação a sua etiologia (MAYEUX, 2004; NAIR, SANDHU e SHARMA, 2014)

Estudos epidemiológicos realizados pelo *Surveillance, epidemiology and end Results* (SEER) demonstraram que entre os homens (20-49 anos), as taxas de incidência de câncer aumentaram em média 0,6% ao ano durante 1999 a 2008 e diminuíram em média 0,7% ao ano entre 2008 e 2015 (HYNDMAN, 2016). Entre as mulheres (20- 49 anos) as taxas aumentaram em média 1,1% ao ano entre 1999 e 2009, permanecendo estável entre 2009 e 2012 e aumentou 1,8% ao ano entre 2012 e 2015. Apesar do enorme progresso feito nos últimos anos, no campo de diagnóstico, além de novos tratamentos introduzidos, no ano de 2015, estes grupos neoplásicos foram responsáveis por 12.7 milhões de mortes em todo o mundo (HYNDMAN, 2016).

De forma geral, as células cancerígenas podem ser detectadas através de modificações em três classes principais de genes: oncogenes, genes supressores tumorais e genes de reparo do DNA (WOGAN et al., 2004). Evidência clínicas já demonstraram que a detecção do câncer nos estágios iniciais auxilia em uma intervenção precoce e mais precisa da doença (SRIVASTAVA e CREEK, 2018). Por exemplo, Richard et al. 2000, demonstraram que pacientes com câncer de mama tratados mais precocemente tiveram uma sobrevida de 7% em comparação com pacientes tratados mais tardiamente (RICHARD et al., 2000). Neste cenário, os diversos marcadores biológicos que são empregados, apresentam um enorme impacto no auxílio do melhor conhecimento acerca do prognóstico, diagnóstico e do tratamento dos vários tipos de cânceres (ARONSON e FERNER, 2017).

1.2 Biomarcadores

Embora existam diversas definições, o termo biomarcador, foi definido a partir da Organização Mundial da Saúde (OMS), como qualquer substância, estrutura ou processo que possa ser medido no corpo ou em seus produtos, que possa influenciar ou prever a incidência de resultado ou doença (STRIMBU e TAVEL, 2010).

A implementação das ômicas (proteômica e genômica) que visam a caracterização e quantificação coletiva de conjunto de moléculas biológicas, representaram a principal rota para descoberta de novos biomarcadores aos longo dos últimos anos (NALESKJA, 2014; ROBB, McINNES e CALIFF, 2016). Como consequência, a partir de novas metodologias empregadas, vários tecidos e fluidos, incluindo sangue, urina, saliva, aspirado de medula óssea e líquido cefalorraquidiano, começaram a ser analisados para possível identificação e quantificação de quaisquer tipos de biomarcadores (AIZPURUA-OLAIZOLA et al., 2017)

Os biomarcadores podem ser usados para diversos propósitos, onde sua aplicação está diretamente relacionada com a finalidade do estudo. Podendo ter como objetivos avaliar a exposição a determinados agentes químicos, avaliar os efeitos das substâncias químicas e avaliar a susceptibilidade individual (CALIFF, 2018)

A identificação de novos biomarcadores é essencial na implementação de estratégias personalizadas de assistência à saúde que ofereçam novas abordagens terapêuticas com tratamento otimizado e individualizado, além da confirmação diagnóstica de intoxicação aguda ou crônica (AIZPURUA-OLAIZOLA et al., 2017).

1.3 Tipos de Biomarcadores

Na prática, os biomarcadores incluem ferramentas e tecnologias que auxiliam na previsão, causa, diagnóstico, progressão, regressão ou resultado do tratamento da doença. Independente da sua finalidade e aplicação, os biomarcadores, podem ser classificados em três tipos (BRUCKER, 2019) (Tabela 1).

Tabela 1. Principais tipos de biomarcadores e suas funções.

Tipo	Função
Exposição	Produtos ou metabólitos químicos mensurados no organismo para avaliação a exposição individual ou de um grupo, estabelecendo uma ligação entre a exposição externa e quantificação da dose interna.

Efeito Alterações quantificáveis que um indivíduo suporta decorrentes da exposição e absorção de alguma substância química, acarretando em alterações pré-clínicas ou efeitos adversos à saúde

Suscetibilidade Permite elucidar o grau de resposta da exposição provocada nos indivíduos

Adaptado. BRUCKER, 2019.

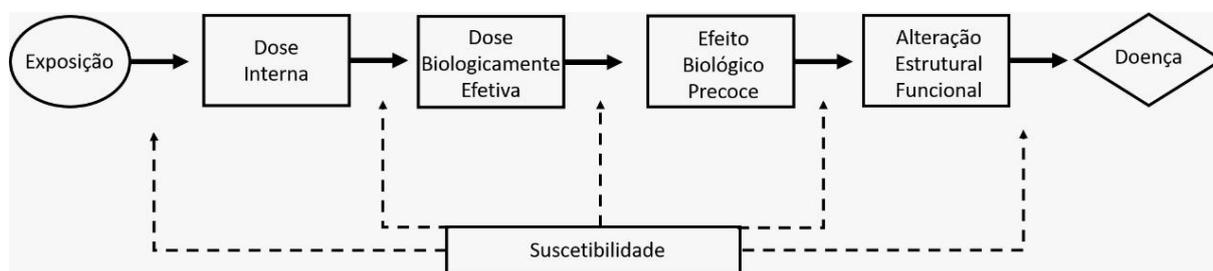
Os biomarcadores de exposição se diferenciam entre dose interna e a dose biologicamente efetiva, representando a distribuição e quantidade da substância ou de seu metabólito presente no organismo que foi absorvida, e a quantidade real que atinge os tecidos e alvos moleculares, respectivamente. Desta forma, da quantidade total absorvida, somente uma porção chegará até o tecido alvo, onde apenas uma pequena fração irá agir como a dose biologicamente ativa (AMORIM, 2003; MUSSALI-GALANTE et al., 2012).

Diariamente, os indivíduos são expostos direta ou indiretamente a agentes com alto poder carcinogênico, seja essa exposição, a partir do estilo de vida, como o hábito de fumar ou beber, ou a partir da exposição ocupacional, como os trabalhadores agrícolas e frentistas. Neste cenário, a escolha de marcadores biológicos fidedignos para cada uma das formas de dose interna é de extrema importância para a sua maior eficácia e sensibilidade (MUSSALI-GALANTE et al., 2012).

Os biomarcadores de efeito consistem em alterações fisiológicas, bioquímicas ou genéticas que possa indicar um efeito precoce ou clínico, que reflita entre a interação da substância química com os seus receptores biológicos (SILINS e HÖGBERG, 2011). De forma geral, as alterações bioquímicas, como por exemplo, dosagens de creatinina sérica e albumina são consideradas marcadores biológicos nefrotóxicos de efeito precoce, devendo-se ao fato, que estas alterações precedem a um dano estrutural, ou seja, a doença propriamente dita. Enquanto, as alterações cromossômicas, são reconhecidas como valiosos marcadores biológicos de efeito tardio, onde já existe um dano estrutural reversível ou não, e geralmente cursa com a doença já estabelecida (SRAM et al., 2011).

Os biomarcadores de suscetibilidade indicam a predisposição genética ou fatores externos, como dieta, idade e estilo de vida que possam influenciar a suscetibilidade de indivíduos expostos a substâncias químicas (Figura 1).

Figura 1. Diagrama esquemático da ação de um biomarcador



Adaptado. AMORIM et al. 2003. Resposta progressiva do organismo a exposição a um agente químico e os fatores suscetibilidade que pode catalisar sua progressão.

1.5 Fatores de risco para o câncer

O termo risco é empregado para definir a probabilidade de um indivíduo sadio, exposto aos mais diversos fatores ambientais ou hereditários que possa desenvolver uma doença. Desta forma, no câncer, as primeiras manifestações podem surgir após exposição a agentes carcinogênicos de forma única ou crônica aos diversos elementos que compõem os fatores de risco (BRUCKER, 2019).

1.5.1 Tabagismo

Embora a prevalência do tabagismo tenha diminuído consideravelmente em todo o mundo, o número absoluto de fumantes aumentou com quase um bilhão de fumantes diários, sendo considerado o segundo maior fator de risco de morte no mundo (CDCP, 2010). Cada cigarro é formado por uma mistura de milhares de compostos, incluindo mais de 60 substâncias cancerígenas já documentadas e estabelecidas. Os agentes cancerígenos presentes na fumaça do cigarro, pertencem a várias classes químicas, onde sofrem processos metabólicos distintos, mas geralmente catalisado pelas enzimas citocromo P-450 (CDCP, 2010; KORC et al., 2017).

A ativação metabólica de agentes cancerígenos presentes no cigarro, resultam nas formações de adutos de DNA, que são fundamentais no processo carcinogênico. Os adutos de DNA podem causar erros durante o processo de replicação do DNA, a partir de inserção de nucleotídeos errôneos, quando as enzimas DNA polimerases de alta fidelidade processam estes adutos de forma incorreta (O'KEEFFE et al., 2018). Neste contexto, um quadro de mutação gênica pode ser estabelecido, causando a perda de funções normais no controle de crescimento

celular, resultando em proliferação celular exacerbada. Desta forma, há evidências suficientes para inferir uma relação causal entre o tabagismo e principalmente o desenvolvimento de câncer de pulmão, faringe, pâncreas e leucemia mieloide aguda (KORC et al., 2017).

1.5.2 Radiação Ultravioleta

O câncer de pele é a forma mais comum de câncer nos Estados Unidos, representando mais de um terço de todos os casos de câncer em todo o país, com uma incidência estimada em 600.000 casos por ano (LEITER, EIGENTLER e GARBE, 2011; WATSON, HOLMAN, MAGUIRE-EINSEN, 2016). No Brasil, demonstra-se como o mais frequente tipo de câncer, correspondendo cerca de 30% de todos os tumores malignos, e como uma média de 180.000 novos casos por ano. Desta forma, esta prevalência é decorrente de uma combinação de fatores genéticos, onde um indivíduo apresenta alguma susceptibilidade ao desenvolvimento de um câncer, associados principalmente a uma exposição crônica a radiação ultravioleta (UV) (WATSON, HOLMAN, MAGUIRE-EINSEN, 2016).

A exposição aos raios UVs estimulam os melanócitos a produzirem cada vez mais melanina, acarretando em uma pele mais bronzeada. Porém, em condições de exposição crônica, ocorrem danos irreversíveis ao DNA das células da pele, desencadeando em mutações que podem levar as células da pele a se multiplicar de forma exacerbada, formando tumores malignos (LINARES, ZAKARIA, NIZRAN, 2015)

1.5.3 Idade

Melhorias na qualidade de vida acarretaram no aumento da expectativa de vida média dos indivíduos nas últimas décadas. De acordo com os dados da OMS, atualmente a expectativa de vida nos países desenvolvidos é superior a 80 anos. Entretanto, o avanço da idade diretamente se relaciona com o declínio das funções fisiológicas de processo vitais do organismo, principalmente do sistema imune (MASLOV, 2009; LOPEZ-OTIN et al, 2013). Desta forma, o processo de envelhecimento demonstra-se como um fator de risco preponderante para uma das causas mais frequentes de mortalidade no mundo, como o câncer (HONG et al., 2019).

O mecanismo entre o desenvolvimento do câncer e o envelhecimento ocorre a partir da exposição exógena a agentes mutagênicos, e radicais livres endógenos, acarretando no acúmulo de danos ao DNA humano ao longo da vida, gerando um quadro de instabilidade genômica (NEGRINI, GORGOULIS e HALAZONETIS, 2010). No contexto de um organismo composto por um quadro de senescência, as células cancerígenas apresentam vantagens de

desenvolvimento e proliferação frente as células saudáveis do organismo (HOEIJMAKERS, 2009).

A partir dos dados estatístico mais recentes do *Surveillance, epidemiology and end Results* (SEER), a idade média de diagnóstico de câncer é de aproximadamente 66 anos, mais especificamente de 61 anos para câncer de mama, 68 anos para câncer de colorretal, 70 anos para câncer de pulmão e 65 anos para as Síndromes Mielodisplásicas (SMD) (AUNAN, CHO e SOREIDE, 2017).

1.6 Patogênese da Síndrome Mielodisplásica

As células cancerígenas apresentam um perfil de grande instabilidade genética devido a ação de diversos fatores endógenos ou exógenos que as atingem constantemente. Nesse cenário, a presença de mutações somáticas, podem desencadear quadros de proliferação celular exacerbada ou a uma diminuição do processo de apoptose, dependendo de qual mutação gênica esteja envolvida (HARFELACH, 2018).

O risco de formação de um clone hematopoiético sem a presença de citopenias ou displasias aumenta significativamente com o avanço da idade, sendo detectada em até 10% dos indivíduos com idade superior a 70 anos (FOLLO et al., 2019). Desta forma, os pacientes portadores da SMD, as alterações cromossômicas podem ser encontradas em até 50% do casos, sendo detectadas rotineiramente a partir do cariótipo convencional (banda-G) ou a partir da citogenética molecular pela hibridização *in situ* por Fluorescência (FISH), quando o cariótipo apresenta um baixo índice de metáfases (<10) (HOSONO, 2019).

A fisiopatologia da SMD envolve diversas alterações genéticas, imunológicas e epigenéticas na célula progenitora hematopoiética, podendo acarretar na formação de um ou mais clones anômalos (BEJAR et al., 2014). As mutações somáticas encontradas nos pacientes com SMD, podem ser detectadas ao diagnóstico ou durante o curso progressivo da doença (CHAMSEDDINE et al., 2016).

Com o advento da metodologia de sequenciamento mais robusto do *Next Generation Sequencing* (NGS), diversos estudos foram publicados ao longo dos anos descrevendo uma análise cada vez mais completa acerca das diversas mutações presentes na SMD. Um dos primeiros trabalhos, foi realizado por Bejar et al. (2011) onde realizaram a análise de 18 genes em 439 pacientes (BEJAR et., 2011). Posteriormente, Papaemmanuil et al. (2013) realizaram uma análise mais robusta, com 111 genes alvos com 738 pacientes, ampliando o escopo das

mutações mais comuns na SMD (Papaemmanuil et al., 2013). Haferlach et al. (2014) realizaram um estudo a partir de vários genes alvos, onde a mutação do *SF3B1* foi observada em 82,2% dos casos de SMD com Sideroblastos em Anel (SMD-SA) (240\292), sendo a única mutação que demonstrou um prognóstico favorável, com um aumento da sobrevida do paciente e uma baixa porcentagem de blastos (HAFERLACH et al., 2014).

A partir destes estudos com a tecnologia do NGS, foi possível observar que cerca de 90% dos pacientes com SMD apresentam pelo menos uma mutação pontual, podendo afetar genes vitais em vários processos de homeostase celular (JONAS e GREENBERG, 2015; CARGO e BOWEN, 2017) (Tabela 2).

Tabela 2. Impacto Prognóstico das mutações mais recorrentes na SMD

FUNÇÕES	GENES
<p style="text-align: center;">Modificadores epigenéticos <i>Splicing</i> Diferenciação Resposta a dano de DNA/apoptose Complexo coesina Sinalização</p>	<p style="text-align: center;"><i>TET2^a, DNMT3A^c, ASXL1^c, EZH2^c</i> <i>SF3B1^a, SRSF2^c, U2AF1^c, ZRSR2^c</i> <i>RUNX1^c</i> <i>TP53^c, BCOR^c</i> <i>STAG2^b</i> <i>CLB^b</i></p>

Adaptado. JONAS e GREENBERG, 2015. Legenda: ^a Impacto favorável no prognóstico, ^b Impacto neutro no prognóstico e ^c Impacto desfavorável no prognóstico.

1.7 Mecanismos de respostas aos danos no DNA

A molécula de DNA sofre cerca de 10.000 lesões por dia, danos estes, desencadeados por diferentes fatores: processos endógenos (depurinação e metabolismo celular), reações com espécies reativas de oxigênio, exposição a agentes radiativos, poluentes e tratamentos com quimioterápicos (HOEIJMAKERS, 2009).

As células respondem aos danos, reparando-os a partir de diversas proteínas efetoras presentes do ciclo celular. As proteínas detectam a lesão através do processo de transdução do sinal, a partir disso, executam inúmeras funções para que aja a homeostase celular (OZTURK e DEMIR, 2011). Quando as lesões são refratárias, irão acarretar em uma instabilidade cromossômica e interferência processo de replicação do DNA, podendo provocar apoptose e mutações (LIVNEH, ZIV e SHACHAR, 2010).

Nosso organismo apresenta um maquinário de reparo a molécula de DNA, consistindo em dois mecanismos que reparam lesões de fita simples e fita dupla (LANGE, TAKATA e

WOOD, 2011). Porém, surgem situações em que as lesões não podem ser reparadas, e para evitar a morte celular, a célula é forçada a tolerar esses danos. As células adquiriram esse mecanismo de tolerância à lesão, permitindo que ocorra um bloqueio da replicação pelas DNA Polimerases de alta fidelidade (POL I e POL III) (LANGIE et al., 2015). A ativação do mecanismo de tolerância é mediada por alterações do antígeno nuclear de proliferação (PCNA) Entretanto, as polimerases com atividade translesão (TLS) apresentam maior risco a incorporar erros. (ANDERSEN, XU e XIAO, 2008; LANGIE et al., 2015).

1.8 DNA Polimerases com atividade translesão (TLS)

A PCNA é ativada a partir do processo de monoubiquitinação do seu resíduo de lisina 164 e apresenta-se como o principal regulador da alternância entre as polimerases replicativas de alta fidelidade e a classe de polimerases com atividade de translesão (TLS) (ALVAREZ et al., 2019). A PCNA, uma proteína que apresenta conformação de anel, que circunda a região específica da dupla hélice de DNA que sofreu a lesão (MARCH e BIASIO, 2017).

As DNA Polimerases com atividade TLS contém um domínio de ligação de ubiquitina, no qual interage com o PCNA, para a sua ativação (LIVNEH, ZIV e SHACHAR, 2010). Estas classes de enzimas apresentam a habilidade de ultrapassar a lesão sem removê-la, ou corrigir o dano, dando prosseguimento na replicação de um pequeno fragmento de DNA (LIVNEH, ZIV e SHACHAR, 2010). Após esta etapa, as polimerases TLS saem da forquilha de replicação e as DNA polimerases de alta fidelidade retomam o processo replicativo. Estas enzimas de reparo TLS, são consideradas de baixa fidelidade no sentido da síntese de novos nucleotídeos e propensa a erros (FUCHS e FUJI, 2013).

A morfologia das polimerases TLS apresentam-se com um domínio adicional, dessa forma, seu sítio ativo é mais espaçoso do que as DNA polimerases de alta fidelidade, podendo acomodar grandes lesões, entretanto, não conseguem encaixar nas restrições mais apertadas, devido a sua forma mais extensa (GOODMAN e WOODGATE, 2013). A partir disso, em virtude da sua baixa fidelidade na incorporação dos nucleotídeos durante a tentativa de reparo, associado ao mecanismo de ultrapassar lesões características da TLS, podem acarretar em um acúmulo de mutações nas células (GOODMAN e WOODGATE, 2013).

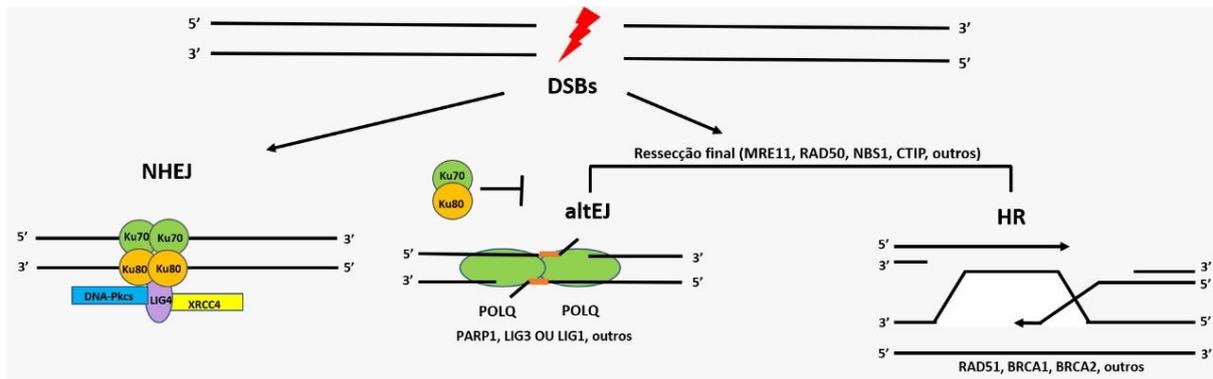
1.8.1 Família de DNA polimerases A: Polimerase TLS theta (θ) e nu (ν)

A polimerase theta (θ) é uma proteína formada por 2590 resíduos de aminoácidos, codificada pelo gene *POLQ*, que apresenta-se localizado no braço longo do cromossomo 3 (MALABY, 2017). Esta proteína apresenta uma configuração de domínio distinta das outras polimerases, formada em uma das extremidades da cadeia polipeptídica por uma porção N-terminal semelhante a helicase e na sua porção final da cadeia por um domínio C-terminal (YOUSEFZADEH e WOOD, 2013).

Esta enzima é amplamente expressa em tecidos saudáveis de mamíferos, sendo importante, na prevenção de grandes deleções do DNA, desempenhando assim, um papel alternativo no mecanismo de reparo em lesões de fita dupla (WOOD e DOBLIÊ, 2017).

Em condições normais, as lesões de fita dupla, são reparadas através de duas vias principais, sendo elas as junções de extremidade não homólogas (NHEJ) ou a recombinação homóloga (HR). A ativação da via de reparo por NHEJ é estritamente dependente da ligação do complexo Ku70/Ku80 nas extremidades do DNA que sofreu a lesão (BEAGAN e McVEY, 2016). Desta forma, em um cenário onde o reparo não é realizado pela NHEJ, as cadeias terminais 5' das extremidades do DNA são excisadas, gerando assim uma molécula de fita simples 3', ativando as proteínas efetoras que compõem a HR (THOMPSON, 2012). A configuração das extremidades do DNA lesionado, irão determinar quais das vias de reparo irão ser empregadas, podendo surgir situações, onde estas não sejam compatíveis com a ativação clássica da NHEJ, ou a excisão final para ativação da HR esteja desregulada, desencadeando através polimerase theta (θ), um subcaminho da NHEJ, a partir da junção de extremidades alternativas (altEJ) (SHIBATA et al, 2011; WOOD e DOBLIÊ, 2017) (Figura 2). A polimerase theta (θ) apresenta uma habilidade única de adicionar nucleotídeos na extremidade 3' de DNA de fita simples, a partir do reconhecimento de microhomologias, que são regiões curtas de nucleotídeos complementares, geralmente compreendo entre 5-25 pares de bases. Este reconhecimento ocorre através do seu domínio helicase, sendo as lacunas preenchidas pela polimerase theta (θ) (CHANG et al., 2017).

Figura 2. Mecanismos de reparo em lesões de fita dupla no DNA.



Adaptado. WOOD e DOBLIÊ, 2017. Danos de fita dupla no DNA (DSBs) podem ser reparados pelo cNHEJ através de processamento final mínimo. Se as extremidades do DNA forem excisadas para produzir extremidades de fita simples de 3' um caminho de reparo alternativo através da altEJ pode ser utilizado, envolvendo a pol θ . Alternativamente, a recombinação homóloga (HR) pode ocorrer, dependendo em disponibilidade de uma cópia do gene danificado.

Apesar de sua atuação como um via alternativa no processo de reparo, esta enzima apresenta um perfil propenso a mutação, devido à falta de atividade exocleásica de revisão (QUINET et al., 2018). Em um estudo realizado para a avaliação da fidelidade e extensão das DNA polimerases TLS, observou-se que a pol (θ) frequentemente incorpora uma guanina ou timina em frente a outra timina, constando-se que *POLQ* pode gerar erros de incorporação errôneas de nucleotídeo, até 100 vezes maiores em comparação com as outras polimerases TLS (ARANA et al., 2008).

POLQ faz parte de um grupo de genes que conferem uma vantagem de sobrevivência aos tumores. Uma análise realizada por Kawara et al. (2004) compararam a expressão de *POLQ* no tecido tumoral e no tecido controle correspondentes dos mesmos indivíduos, observando um hiperexpressão deste gene nos tecidos cancerígenos de estômago, pulmão e colón. Quando subdividiram o câncer de colón em dois grupos, com base na expressão de *POLQ*, demonstraram que o grupo que expressava níveis mais alto, apresentaram uma sobrevida mais baixa, com uma média de 24 meses (KAWARA et al., 2004). Em uma análise relacionada ao câncer de mama, observou-se que dentre os 14 genes alvos do estudo, apenas a expressão da *POLQ* era maior nos tecidos do câncer em comparação normais. Além de estar presente dentre os genes mais frequentemente expressos no carcinoma epidermóide oral no Brasil. Neste cenário, especula-se que a polimerase theta (θ) atue como um condutor no processo de carcinogênese (VAISMAN e WOODGATE, 2017).

A polimerase nu (ν) é codificada pelo gene *POLN* e está localizado na região p16.2 do cromossomo 4. As enzimas pol(θ) e pol(ν) apresentam a falta da atividade exonucleásica de revisão, sendo as únicas polimerases com atividade TLS que apresentam uma alta expressão em pacientes com câncer de mama (BEAGAN e McVEY, 2016). Aproximadamente 50% dos carcinomas mamários apresentam algum tipo de mutação envolvendo a polimerase nu (ν), sugerindo que o *POLN* esteja envolvido em algum processo da patogênese desta doença (TAKATA et al., 2015).

1.8.2 Família B de DNA Polimerases: TLS Polimerase zeta (ζ)

A polimerase zeta (ζ) foi a primeira DNA polimerase com atividade TLS a ser descoberta, constituída por uma proteína heterodimérica formada por quatro subunidades: a porção catalítica REV3, estrutural e regulatória REV7 e acessórias p50 e p66, codificadas a partir do gene *REV3L*, que está localizada no sítio frágil (FRA6F) no cromossomo 6q21 (KNOBEL, 2011). A ausência de sua função catalítica nas células eucarióticas geralmente é letal para manutenção da estabilidade genômica, sendo esta região apresentando comumente deletada na maioria das neoplasias hematopoiéticas (IGNATOV, BONDARENKO e MAKAROVA, 2017).

A suas duas subunidades REV3 e REV7 aparecem desprovidas da atividade exonucleásica de revisão, presentes na maioria das DNA polimerases da família B de alta fidelidade (MARTIN e WOOD et al., 2019). Entretanto, a taxa de erro da polimerase zeta (ζ) é menor quando comparada a família Y das polimerases TLS. Em modelos de leveduras, pol zeta (ζ) apresentou uma taxa de erro de 1 base a partir de 770 nucleotídeos copiados, sendo quase cinco vezes mais eficazes que as polimerases da família Y (VAISMAN e WOODGATE, 2017).

A partir do *knockout* do REV3 em modelos murinos de fibroblastos embrionários, observou-se um aumento da instabilidade cromossômica, onde a perda da sua atividade é fatal para a sobrevivência celular (SHANBHAG et al., 2018). A polimerase zeta promove a estabilidade genômica, a partir do processo de tolerância aos danos na fita de DNA, reduzindo assim o cenário de lesões espontâneas (YANG e GAO, 2018). Esta ação deve-se a uma grande particularidade destas enzimas, de estender-se através da fita molde, a partir de uma região distorcida do DNA, devido a uma inserção de bases errôneas ou acomodação de grandes lesões, formadas por outras polimerases TLS (SHARMA e CANMAN, 2012; IGNATOV, BONDARENKO e MAKAROVA, 2017).

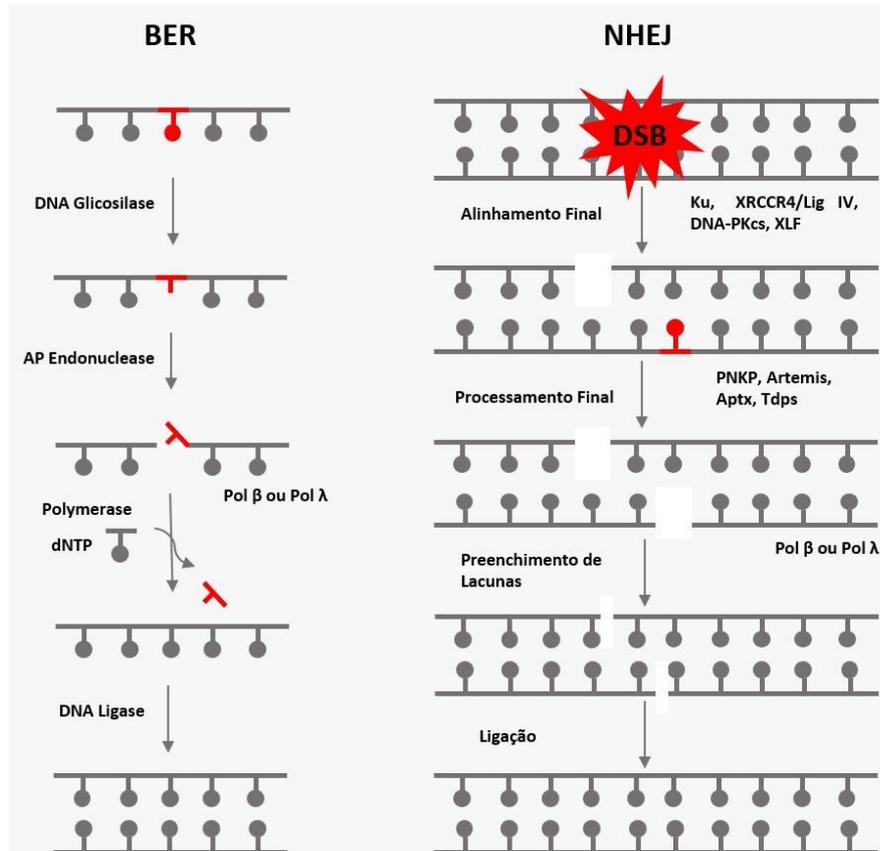
1.8.3 Família X: TLS polimerase lambda (λ)

A polimerase lambda (λ) é a maior das quatro polimerases da família X humana, constituída por uma subunidade única monomérica, composta por 575 aminoácidos, com uma massa molecular de 65kDA, sendo codificado pelo gene *POLL*, localizado no cromossomo 10 (MOON et al., 2007). Esta enzima, assim como as outras enzimas TLS, não apresenta atividade exonucleásica de revisão, desta forma, gera inserções de nucleotídeos de forma mais propensa a erros durante o processo de transcrição, em taxas mais elevadas quando comparadas com as polimerases TLS da família Y (KNOBEL, 2011).

Uma das lesões mais comuns encontradas em nossas células são os pequenos danos as bases de fita simples no DNA reparadas partir do reparo de excisão de base (BER), causadas principalmente pelo 8-oxo-2'-desoxiguanosina (8-oxodG), induzida por espécies reativas de oxigênio, geradas a partir do metabolismo celular (BEBENEK, PEDERSEN e KUNKEL et al., 2014). Neste cenário, a pol (λ) pode auxiliar na via BER, funcionando como um *backup* na ausência da polimerase beta (β) (Figura 3). Estudos já demonstraram que as células DT40 de frango e fibroblastos embrionários de camundongos com nocaute duplo pol β (- / -) e pol λ (- / -) são significativamente mais sensíveis que as células pol β (- / -) á agentes oxidantes e alquilantes do DNA, reforçando a função de *backup* da pol λ e o seu papel na via BER (TANO et al., 2007; BRAITHWAITE et al., 2010). A polimerase (λ) apesar de incorporar de maneira relativamente eficiente a DesoxiAdenosina Trifosfatada (dATP) e DesoxiCitidina Trifosfatada (dCTP) contrário a lesões por 8-oxodG, na presença da PCNA, apresenta uma preferência mais elevada para a incorporação de dCTP em vez de dATP oposto a 8-oxodG em comparação a outras polimerases TLS, gerando um quadro mais propenso a mutações (MAGA et al., 2007).

Além do seu domínio catalítico, a polimerase lambda (λ) possui um domínio específico N-terminal de câncer de mama-terminal (BRCT) (RAMSDEN, 2010). A presença do BRCT N-terminal confere a pol (λ) habilidade de ligação a um fosfopeptídeo, comum entre as proteínas de reparo do DNA, apresentando interação com os dois complexos essenciais, Ku70\Ku80 e XRCC4, presentes na via de reparo de fita dupla por NHEJ (YU et al., 2003; BEBENEK, PEDERSEN e KUNKEL et al., 2014) (Figura 3). Desta forma, já foi demonstrado *in vitro* que a polimerase lambda está presente no processo de NHEJ em extratos celulares de *HeLa* (LEE, et al., 2004).

Figura 3. DNA polimerase (λ) participa nas vias do BER e NHEJ.



Adaptado. BEBENEK, PEDERSEN e KUNKEL et al., 2014. A) Representação esquemática da via do BER. O nucleotídeo com a base danificada é de cor vermelha. (B) Representação esquemática da via NHEJ. Um nucleotídeo na extremidade 5' danificado é de cor vermelha. A polimerase lambda (λ) pode atuar nas duas vias de reparo como *backup* na ausência da polimerase beta (β) (Abreviações: Ku, KU70-80 heterodímero; DNA-PKcs, subunidade catalítica da proteína kinase dependente de DNA; LigIV, ligase IV; PNKP, fosfato de polinucleotídeo-fosfatase kinase; XLF, fator do tipo XRCC4; Apx, aprataxina; Tdps, tirosina fosfodiesterases).

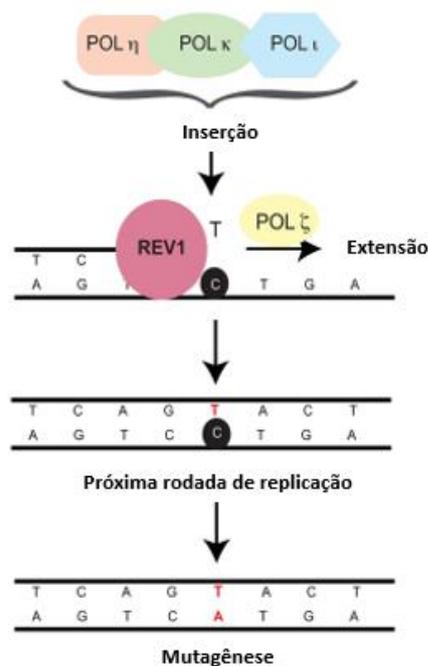
1.8.4 Família Y: Rev1 e polimerases eta (η), kappa (κ) e iota (ι)

As polimerases TLS que compõem a família Y são compostas pelos domínios que as polimerases replicativas de alta fidelidade geralmente contém, denominados, polegar, palma e dedo, porém contém um quarto domínio adicional exclusivo, chamado dedo mindinho ou domínio associado a polimerase (PAD), fazendo contato com lesões mais robustas no DNA (STERN et al., 2019).

REV1 é composta por 1251 aminoácidos e com um peso molecular de 138kDa. Esta enzima possui uma habilidade de inserir uma citosina oposta a uma guanina, devido a catalisar uma reação de transferência da monofosfato de desoxicitidina (dCMP) transferase, que apresenta uma alta afinidade com o nucleotídeo guanina (MANKE et al., 2003; SASATANI, 2017). Além disso, REV1 apresenta mecanismos que permitem que insiram nucleotídeos, de preferencial citosina, de forma oposta a sítios abásicos (GAO et al., 2017).

Estudos a partir de modelos murinos e humanos, já demonstraram que REV1 está envolvido no processo de TLS em lesões causadas por raios ultravioletas (UVs), funcionando principalmente no recrutamento de outras polimerases TLS como eta (η), kappa (κ), iota (ι) e zeta (ζ) nas etapas de inserção e extensão dos nucleotídeos opostos as lesões (YAMANAKA et al., 2017). Para a etapa de inserção, o domínio carboxi-terminal (CTD), um componente específico do REV1 interage com a região de interação REV1 (RIR) das polimerases de inserção (pol η , pol κ e pol ι). Em um segundo momento, a pol zeta (ζ), realiza a etapa de extensão da fita, interagindo com uma região distinta de reconhecimento da RIR, entrando em contato com aminoácidos específicos localizados no REV7 (YAMANAKA et al., 2017). Neste cenário, apesar de apresentar uma atividade catalítica importante, tem sido demonstrado que REV1, desempenha uma função mais importante no papel de regulação das ações das outras polimerases TLS (YANG e GAO, 2018) (Figura 4).

Figura 4. Atuação das polimerases TLS em cenário de danos ao DNA.



Adaptado. Yamanaka et al 2017. Para transpassar os danos no DNA, REV1 recruta outras polimerases TLS (POL ι , POL κ , POL η), para replicar através do dano. Posteriormente, o complexo POL ζ pode ajudar a estender-se além do dano, permitindo o reinício da replicação de DNA partir de uma região não danificada. Se um nucleotídeo incorreto for incorporado ao longo do dano, esse nucleotídeo errôneo levará a uma mutação na próxima rodada de replicação.

A polimerase eta (η) consiste em uma proteína de 78 kDa, codificada pelo gene *POLH*, localizada no cromossomo seis, sendo a única DNA polimerase conhecida por seu papel anticâncer antes mesmo do gene e proteína terem sido caracterizadas (YAMANAKA, et al., 2017). Pol η é encontrada em todos os seres eucarióticos, agindo tanto nas etapas de inserção e extensão das TLS. Mutações na polimerase eta (η) estão relacionadas com a presença da variação da forma do Xeroderma Pigmentoso (XP-V), uma síndrome caracterizada pela sensibilidade aos raios UVs, causando um aumento da incidência de doenças relacionadas a pele (POWERS e WASHINGTON, 2018). Esta polimerase atua como uma espécie de protetora ao excesso de exposição aos raios UVs, a partir da sua habilidade de transpassar e corrigir essas lesões nas células (VAISMAN e WOODGATE, 2017).

A polimerase kappa(κ) é uma proteína de 99 kDa que contém 870 resíduos de aminoácidos, codificada pelo gene *POLK* localizado no cromossomo cinco (STERN et al., 2019). Esta polimerase que atua tanto nas etapas de inserção e extensão, são especializadas em transpassar lesões formadas por benzopireno, geradas a partir do tabaco e gás de combustão (STERN et al., 2019). Dentre as polimerases TLS que compõem a família Y, a polimerase kappa (κ) é a mais fiel na incorporação dos nucleotídeos, com uma taxa de erro variando entre 10^{-3} a 10^{-4} em áreas livres de danos (FUCHS e FUJIII, 2013; YANG e GAO, 2018). Apesar disso, a pol (κ) apresenta mais expressão em alguns tipos de câncer de pulmão e gliomas, sendo em alguns casos, correlacionados com um processo de instabilidade genômica (LANGE, TAKATA e WOOD, 2011).

A proteína polimerase iota (ι) é composta por 715 resíduos de aminoácidos, sendo codificada pelo gene *POLI*, localizado no cromossomo 18 (ZOU et al., 2016). As polimerases iota (ι) eta (η) apresentam-se geralmente associadas na forquilha de replicação, sugerido assim que estas enzimas formam um complexo com as polimerases replicativas, garantindo assim um processo de estabilidade entre as três polimerases (STERN et al., 2019).

A ação da pol iota (ι) é dependente do tipo de lesão causada pelos raios UVs, não sendo sua função primária. Nesse contexto, na ausência da pol eta (η), esta enzima acaba agindo como um *backup* no anseio de transpassar a lesão, sendo este processo causador de uma elevada taxa

de mutações, podendo explicar a alta incidência de câncer de pele em pacientes com XP-V (ZOU et al., 2016).

2. Agrotóxicos

2.1 Aspectos Gerais dos Agrotóxicos

Durante o período que compreendeu as duas grandes guerras mundiais, houve um intenso crescimento tecnológico e científico no mundo (CARNEIRO et al.,2015). De forma principal, durante a Segunda Guerra Mundial, ocorreu um intenso desenvolvimento científico no campo da indústria química, impulsionada principalmente pela busca por produtos químicos que pudessem ser utilizadas como armas biológicas (BORSOI et al., 2015).

Ao fim da segunda guerra, a partir da década de 1950, iniciou-se a chamada Revolução Verde, com o objetivo principal de acabar com a fome existente no mundo, devido ao grande crescimento populacional e econômico (COSTA e PIRES, 2016). Neste período, que compreendeu entres os anos de 1940 a 1970, foi possível observar profundas mudanças no processo tradicional da produção agrícola, com a mecanização rural, aquisição de novas tecnologia, a partir do uso de fertilizantes e agrotóxicos, que acarretaram no aumento da produtividade agrícola através do controle de insetos e outras pragas (SERRA et al., 2016).

Nesse contexto, estas novas tecnologias impulsionadas a partir da Revolução Verde não demoraram para chegar ao Brasil, sendo um país privilegiado por apresentar uma vasta extensão territorial e clima favorável ao plantio de diversos tipos de culturas (SERRA et al., 2016). A partir de diversos subsídios estatais, incentivos fiscais, além da ausência de políticas mais rigorosas que regulamentem o uso de agrotóxico, o Brasil tornou-se em 2008 o maior consumidor de agrotóxicos do mundo, e o segundo que mais exporta este produto químico mundialmente (SERRA et al., 2016; TEIXEIRA, DE PAULA e NAPOLITANO, 2019).

2.2 Agrotóxicos no Ceará

O estado do Ceará ocupa a décima terceira posição do ranking de estados consumidores de agrotóxicos do país, oriundos principalmente de incentivos governamentais ao setor, a partir de isenção fiscal de quase 100% do Imposto Sobre Circulação De Mercadorias e Serviços (ICMS) (PIGNATI et al., 2015) (Tabela 3).

Tabela 3. Taxa de consumo de agrotóxicos e áreas plantadas – Ceará (20007-2012)

CEARÁ	2007	2008	2009	2010	2011	2012
Área plantada (hectare)	1.942.332	2.013.268	2.076.295	1.837.447	2.084.945	1.732.234
Taxa de consumo de agrotóxico (kg\ha)	0,91	0,89	0,75	5,05	6,48	7,29

Adaptado. BRASIL, 2014.

Uma das áreas com maior crescimento é o ramo da fruticultura que fica compreendido na região do Baixo Jaguaribe, composto por 13 municípios cearenses. No Ceará, a agricultura familiar representa cerca de 90% dos cultivos, ocupando em média 970 mil pessoas (RIGOTTO et al., 2013). Os pequenos produtores destas localidades, devido ao reduzido acesso à informação tornam-se mais suscetíveis ao manejo inadequado dos agrotóxicos (MILHOME et al., 2009). Rigotto et al. (2013) realizaram uma estudo quantitativo ecológico comparando grupos de indivíduos que viviam em áreas com elevado uso de pesticidas (Quixeré, Limoeiro do Norte e Russas) com controles saudáveis, e como resultado observaram que as taxas de hospitalização por neoplasias eram mais altas nos casos dos indivíduos que eram expostos aos agrotóxicos (RIGOTTO et al., 2013).

2.3 Organofosforados

Os organofosforados (OFs) são por definição os compostos orgânicos que apresentam pelo menos uma ligação covalente entre os átomos de carbono e fósforo (BARBOZA et al., 2018). Apresentam ação contra as enzimas que possuem resíduos do aminoácido serina no seu sítio ativo, sendo assim, inibidores irreversíveis da acetilcolinesterase (aChE), acarretando principalmente em um processo de neurotoxicidade, além de apresentarem efeitos carcinogênicos e endócrinos (PIGNATI et al., 2017; KUMAR et al., 2019).

Foram introduzidos na década de 1970, como substituto dos organoclorados, por serem menos persistentes no ambiente, porém com uma alta toxicidade. Historicamente foram amplamente utilizados como inseticidas e armas químicas durante períodos de guerra, porém, ao longos dos anos foram sintetizados compostos OFs com atividade herbicida (CARNEIRO et al., 2015).

Os agrotóxicos utilizados atingem principalmente o solo e a água, e sua persistência no ambiente variam a partir do modo de aplicação que foi realizada. No ar, o agrotóxico pulverizado pode ser carregado pelo ventos a partir da volatilização dos compostos aplicados, atingindo áreas mais distantes (GAMA et al., 2013; CARNEIRO et al.,2015). No solo, decorrem do derramamento ou do processo de descarte inadequado, podendo contaminar o lençol freático, ou serem carregadas para outros locais a partir da água da chuva. Neste contexto, os principais OFs utilizados atualmente são o glifosato, 2,4-D, fipronil, metamidofós, tidiocarbe e carbendazim (GAMA et al., 2013; CARNEIRO et al.,2015).

2.4 Glifosato

A molécula do glifosato [N-(fosfonometil) glicina] foi sintetizada pela primeira vez em 1950 na Suíça, pelo químico Henry Martin, a partir de uma pequena indústria farmacêutica, onde não conseguiram observar aplicações práticas para o seu uso, sendo a molécula vendida para outras empresas (VAN BRUGGEN et al., 2018; TARAZONA, 2017). Desta forma, no ano de 1969, o químico John E. Franz, da empresa Monsanto, foi o primeiro a sintetizar e testar a molécula do glifosato, sendo logo patenteada para o seu uso como herbicida, sob a marca Roundup® (ANDREOTTI et al., 2018). Em meados dos anos 2000, após a expiração de proteção de patentes nos Estados Unidos, a comercialização de preparações genéricas de glifosato expandiu-se para outras empresas, existindo hoje mais de 750 variações de produto, aplicados nas mais diversas áreas (WILLIAMS et al., 2016).

O glifosato apresenta-se como um herbicida de amplo espectro e não-seletivo sendo amplamente utilizado no campo como dessecante de culturas, sendo aplicado antes do plantio de culturas agrícolas tradicionais, após o plantio de produtos geneticamente modificados e no controle de ervas daninhas, anuais ou perenes que podem competir com as culturas (KIM et al., 2012). Sua utilização não se restringe apenas no campo, sendo utilizado também em parques e bosques de áreas urbanas, com a finalidade principal de remoção de vegetação indesejada, contribuindo para a sua contaminação na água, sedimento e solos (VAN BRUGGEN et al., 2018). Este herbicida bloqueia a síntese dos aminoácidos aromáticos essenciais, fenilalanina, tirosina e triptofano, através da inibição da enzima 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato sintetase (EPSPS), interrompendo o processo de biossíntese das plantas (IBRAHIM, 2015). Na maioria dos tipos de cultivos, o glifosato costuma ser pulverizado, podendo desencadear a partir da

névoa da pulverização desconfortos orais e nasais principalmente para os trabalhadores rurais (SCHRENK, 2018).

As formulações comerciais de glifosato contêm além dos seus sais, produtos químicos adicionais, como os surfactantes, que permitem que seu composto seja mais facilmente absorvido e transportado através da folhagem das plantas, eliminando assim seus tecidos, resultando na sua morte após vários dias (LERRO et al., 2018). Um dos principais surfactantes presentes no glifosato é o composto sebo polietoxilado que potencializa a sua função apoptótica, além de apresentar uma citotoxicidade mais severa, devido acarretar a morte celular necrótica, a partir da inibição das funções da mitocôndria e danos a membrana celular (GILLEZEAU et al., 2019).

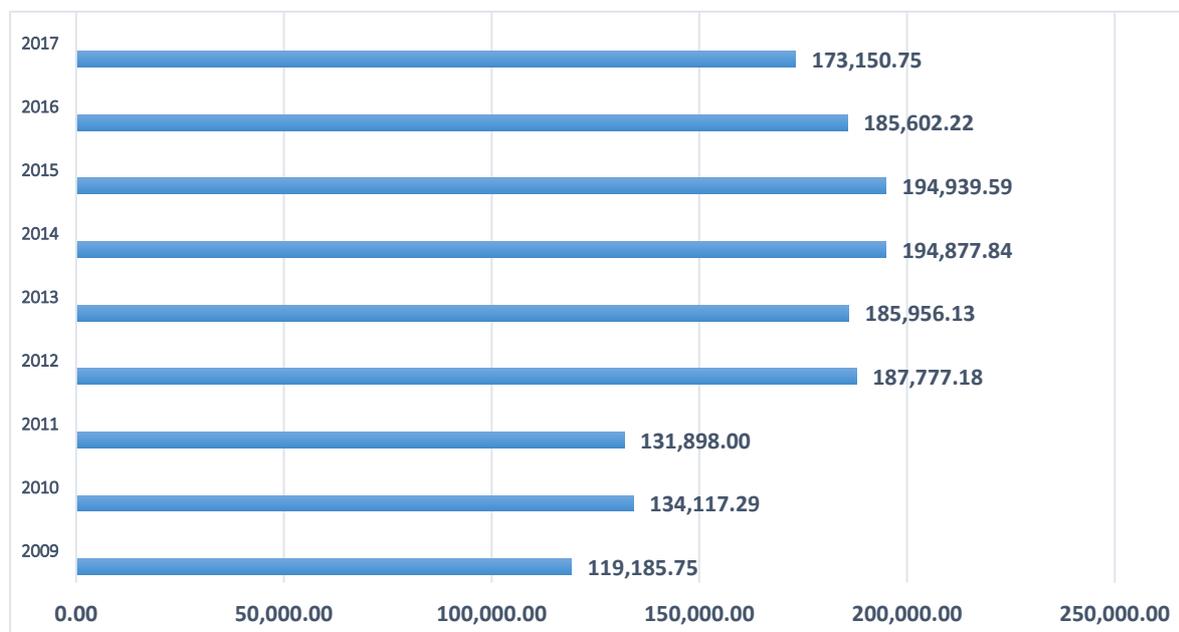
Em março de 2015 a *International Agency Research Classification* (IARC), da OMS a partir da análise de 17 especialistas de 11 países com base em estudos epidemiológicos, e estudos em animais e *in vitro*, classificaram o glifosato como um composto “provavelmente cancerígeno em humanos” enquadrando-o na categoria 2A (WILLIAMNS et al., 2016). Meses seguintes a *European Food Safety Authority* (EFSA) criticaram e reavaliaram as conclusões da IARC, sob o argumento que o estudo da OMS não ter analisado o glifosato de forma isolada, mas em conjunto com as suas substâncias surfactantes (LERRO et al., 2018). Em 2016, no Encontro de Resíduos de Pesticidas, promovido pela OMS, concluíram ser pouco provável que o glifosato constitua um risco cancerígeno para os seres humanos. Como consequência, no ano de 2017, os países da União Europeia votaram pela renovação da licença do glifosato (TARAZONA et al., 2017).

Diversos estudos já demonstraram uma associação positiva entre o uso do glifosato com o desenvolvimento de várias formas de câncer, danos hepáticos e mentais (FLUEGGE e FLUEGGE, 2016; FORTES et al., 2016; SWANSON et al., 2014). Mais recentemente, Kwiatkowska et al. (2017) avaliaram o efeito do glifosato em células mononucleares do sangue periférico, como resultado, observaram um aumento em danos no DNA de fitas simples e dupla na concentração de 0.5mM do herbicida e quando comparado com células controle, a porcentagem de nível global de metilação do DNA diminuiu de forma significativa (KWIATKOWSKA et al., 2017).

No Brasil, no período de 2009 a 2017, o glifosato foi o número um dos ingredientes ativos de agrotóxicos mais vendidos, sendo o herbicida mais comercializado mundialmente (Figura 5) (TEIXEIRA, DE PAULA e NAPOLITANO, 2019). Diante deste cenário, no período de 2007 a 2016, foram notificados 696.066 registros de intoxicação exógenas, dos quais 6.408 (0,9%) foram relacionados com este herbicida (BRASIL, 2018). O glifosato é o principal herbicida

associado às sementes transgênicas, acarretando a médio e longo prazo do aparecimento de plantas mais resistentes, fazendo com que haja um uso cada vez maior deste herbicida (GAZZIEIRO, 2018).

Figura 5. Distribuição da quantidade do ingrediente ativo glifosato no Brasil (2009-2017).



Adaptado. ANVISA, 2018.

2.5 Polimerases TLS como possíveis biomarcadores de efeitos em agricultores e pacientes com SMD

Apesar da grande prevalência do câncer no mundo e dos inúmeros avanços realizados no campo de diagnóstico e tratamento, diversas neoplasias, ainda apresentam a sua fisiopatologia como uma grande lacuna. Neste contexto, a procura de biomarcadores, apresentam-se como uma ótima ferramenta na tentativa de desvendar os mecanismos biológicos envolvidos no diversos tipos de cânceres, entre eles, as Síndromes Mielodisplásicas, onde sua fisiopatologia ainda não são um consenso entre os pesquisadores (TUAL et al., 2019).

A partir de diversas meta-análises e estudos epidemiológicos desenvolvidas ao longos dos anos, é evidenciado entre os pesquisadores, que indivíduos que são expostos direta ou indiretamente a agrotóxicos apresentam um elevado risco de desenvolvimento de diversos tipos de câncer, entre elas a SMD (POYNTER et al., 2017).

Strom et al. (2005) desenvolveram um estudo de caso-controle a partir de 354 pacientes com SMD e 452 controles, com o objetivo de investigar o estilo de vida dos pacientes com os principais fatores de risco da doença, e como principal resultado, observaram um risco

aumentado de desenvolvimento da SMD entre os casos que reportaram exposições ocupacionais a solventes e produtos químicos agrícolas (STROM et al., 2015).

Anos mais tarde, Merhi et al. (2007) a partir de 13 estudos de casos-controle avaliaram a ocorrência da relação entre os fatores ocupacionais dos casos com a ocorrência de neoplasias hematológicas, observando uma associação positiva entre a exposição aos pesticidas e o desenvolvimento de linfoma non-Hodgkin, leucemia e mieloma múltiplo. Entretanto, os resultados relacionadas com SMD foi limitado devido ao pequeno número de casos (MERHI et al., 2007).

Recentemente Jin et al. (2015) a partir de um estudo mais robusto realizaram uma meta-análise com de 1962 pacientes com SMD e 1506 controles saudáveis e observaram que a exposição ao pesticidas podem aumentar o risco de desenvolvimento na SMD em 71% quando comparado a herbicidas ou fungicidas (JIN et al., 2015).

Apesar de vários estudos demonstrarem associação positiva entre exposição crônica a agrotóxicos e desenvolvimento de diversos neoplasias, incluindo a SMD, o mecanismo biológico desencadeado pelos pesticidas e a patogênese da SMD ainda é nebuloso (ALAVANJA et al., 2013). Porém, alguns mecanismos podem ser propostos, onde o contato crônico aos pesticidas, um biomarcador de exposição, pode provocar um desequilíbrio na homeostase celular, afetando genes vitais para o funcionamento do organismo. Desta forma, devido as características únicas da polimerases com atividade TLS, apresentam-se como possíveis candidatas a biomarcadores de efeito, principalmente devido as suas características de transpassar lesões e sua baixa fidelidade de incorporação de nucleotídeos, podendo gerar quadros de mutações.

3 . OBJETIVOS

Objetivo Geral

Analisar os níveis de expressão gênica das enzimas DNA polimerases com atividade TLS em pacientes portadores de SMD, trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos e controles saudáveis.

Objetivos Específicos

1. Avaliar os níveis de expressões gênicas das enzimas *POLH*, *POLL*, *REV3L*, *PCNA*, *POLI*, *REVI*, *POLN*, *POLQ* e *POLK* em células de medula óssea total dos agricultores.
2. Associar os níveis de expressões gênicas das enzimas *POLH*, *POLL*, *REV3L*, *PCNA*, *POLI*, *REVI*, *POLN*, *POLQ* e *POLK* com o resultado citogenético dos agricultores.
3. Associar os níveis de expressões gênicas das enzimas *POLH*, *POLL*, *REV3L*, *PCNA*, *POLI*, *REVI*, *POLN*, *POLQ* e *POLK* em células de medula óssea total dos pacientes com SMD, agricultores e controles saudáveis.

4. METODOLOGIA

4.1 Casuística

O presente estudo apresenta-se como uma ramificação de um projeto que teve início em 2016 dentro do Laboratório de Citogenômica do Câncer, denominado *Poison*. Portanto, à época, foram coletadas amostras de medula óssea de trabalhadores agrícolas expostos a agrotóxicos, com o objetivo de analisar os níveis de expressão gênica da medula óssea desses agricultores que residiam no município de Limoeiro do Norte, na região do Baixo Jaguaribe.

Desta forma, para este presente estudo, foram incluídas 54 amostras de agricultores provenientes do projeto *Poison* considerados como grupo de risco do estudo. Os trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos, foram estratificados em dois grupos a partir do seu modo de produção: Grande Produtor e Agricultura Familiar (RIGOTTO, 2011) (Tabela 4)

Tabela 4. Estratificação do grupo de risco dos agricultores

Grande Produtor	Trabalhadores do agronegócio
Agricultura Familiar	Trabalhadores do segmento pequeno produtor

Em relação ao grupo de amostras de medula óssea dos pacientes portadores das Síndromes Mielodisplásicas, foram utilizados dados de expressão das polimerases TLS de 86 pacientes com SMD, pertencentes ao Laboratório de Citogenômica do Câncer.

Desta forma, para este estudo, foram extraídas 12 amostras de *pool* medular oriunda de indivíduos saudáveis, compreendendo o grupo controle do estudo.

4.2 Aspectos éticos

A presente pesquisa foi submetida e aprovada (Nº processo: 19585619.7.0000.5054) pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal do Ceará/PROPESQ-UFC, através do sistema da Plataforma Brasil, utilizando-se de Termos de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) apresentados na sessão apêndice.

A equipe executora desta pesquisa comprometeu-se a cumprir todas as diretrizes e normas reguladoras descritas na Resolução nº 466 de 12 de dezembro de 2012 do Conselho

Nacional de Saúde que aprova as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos.

4.3 Cariótipo por Banda G

A Citogenética foi realizada de acordo com os protocolos já estabelecidos pelo Laboratório de Citogenômica do Câncer da Universidade Federal do Ceará, segundo a técnica descrita por Chauffaille e adaptada por Pinheiro (PINHEIRO et al, 2009). A medula óssea foi colhida em heparina e de forma estéril foi dividida em dois frascos contendo 7mL de meio RPMI 1640 (pH 7,0), 3mL de soro fetal bovino e 100µL de L-glutamina. Este material foi cultivado por 24 horas em estufa a 37°C. Uma hora antes do término da cultura foram adicionados 50µL de colchicina (Colcemid®) por 30 minutos. Em seguida, o material foi centrifugado e ressuspensão em solução hipotônica de KCl 0,075M e fixado em solução de ácido acético e metanol (proporção 3:1), por 4 vezes. Para confecção das lâminas para análise, o material foi gotejado em lâminas de microscopia óptica e em seguida foram aquecidas por 3 minutos em micro-ondas na potência alta. O bandeamento foi realizado pela técnica de tripsina e as bandas coradas com o Kit Panótico®. Foram analisadas pelo menos 20 metáfases de cada caso, sendo capturadas e analisadas em sistema computadorizado com software para cariotipagem: CytoVision® (Figura 8). Os resultados das análises citogenéticas de medula óssea foram estabelecidos de acordo com os critérios do Sistema Internacional de Nomenclatura Citogenética Humana (ISCN) (SHAFFER E TOMMERUP, 2014).

3.4 Análise da Expressão do mRNA por RT-qPCR

3.4.1 Obtenção de amostras da medula óssea

O número total de amostras do estudo foram de 146 casos, compreendendo 86 pacientes para o grupo de SMD, 54 trabalhadores agrícolas e 06 controles saudáveis. Sendo coletadas a época em tubos de vidro Vacutainer® contendo EDTA e processadas conforme procedimento de rotina do Laboratório de Citogenômica do Câncer do HUWC/UFC.

Para a separação das células do pool celular da medula óssea, realizou-se a transferência da amostra de medula óssea para um tubo do tipo Falcon de 50mL onde foi lavada com solução de lise (25mL de solução de cloreto de amônio 0,144M e bicarbonato de amônio 0,01 M). O conteúdo foi agitado lentamente por 3 minutos e centrifugado a 13200 rpm por 10 minutos a 4°C. Em seguida foi desprezada a fase aquosa e acrescentado 250µL de PBS, dependendo do

volume do material obtido. Posteriormente foi acrescentado 750uL de Trizol LS Reagent® (Invitrogen, EUA) para cada 250uL de volume de PBS aplicado no pool 49 medular. O material foi homogeneizando com pipeta até dissolução completa. Após este procedimento, o material foi armazenado no freezer a -80°C .

3.4.2 Extração de RNA Total

A extração de RNA das células do *pool* medular foi realizada apenas para os controles saudáveis, a partir da utilização do Trizol LS Reagente® de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. Para cada 10^6 células armazenadas em 1mL de Trizol Reagente® foram adicionados 200 μL de Clorofórmio para desproteíntização e 10 μL de glicogênio, foram homogeneizadas em vórtex e, em seguida, centrifugadas a 14.000rpm por 15 minutos a 4°C . Retirou-se o sobrenadante de cada amostra, transferindo para novos tubos, seguidos de precipitação com 400 μL de isopropanol, e incubado por 60 minutos a -20°C , após esse período, foi realizada outra centrifugação a 14.000rpm por 30 minutos a 4°C e o sobrenadante foi descartado por inversão. O pellet formado foi ressuspensão em etanol 70% (v/v) e novamente centrifugado por 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi novamente descartado por inversão e, após seco, o pellet foi diluído em água livre de RNase. Foram realizadas leituras espectrofotométricas em Nanodrop nos comprimentos de ondas de 230, 260 e 280nm, obtendo-se suas relações para posterior aferição de contaminação das amostras.

3.4.3 Síntese de cDNA

A síntese do cDNA foi realizada com a utilização do Kit para Transcrição Reversa (RT) da Applied Biosystems® (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit Applied Biosystems®), de acordo com as recomendações do fabricante.

Para cada reação de transcrição reversa foram utilizados uma quantidade otimizada de RNA total para uma concentração final de 1000ng/uL. Para cada reação, utilizou-se de 2,0 μL de RT buffer, 0,8 μL de Dntp Mix, 2,0 μL de RT Random Primers, 1,0 μL de Multiscribe Reverse Transcriptase™.

A quantidade citada de cada reagente foi multiplicada pelo número de amostras de RNA total para a confecção de um “Mix” de reação. Posteriormente, 5,8 μL deste Mix foi adicionado a cada microtubo de PCR de 0,2mL. Em seguida foram adicionados as quantidades otimizadas de RNA total para cada amostra nos microtubos devidamente identificados em um volume final

de 4,2µL. Por fim, o volume final de 10µL de cada reação foram submetidos ao termociclador onde foram realizados os seguintes ciclos de termociclagem para a síntese de cDNA: 25°C por 10 minutos e 37°C por 120 minutos. Por fim, as amostras de cDNA foram armazenadas em um freezer a uma temperatura de -20°C.

3.4.4 RT-qPCR (PCR quantitativa em tempo real)

A quantificação da expressão gênica dos nove genes avaliados neste estudo (Tabela 4) foi realizada a partir da técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR) realizada no aparelho 7500 Real-Time PCR System® (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, USA) disponível no Laboratório de Citogenômica do Câncer. As reações foram preparadas utilizando-se o Kit TaqMan® Universal PCR Marter Mix (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, USA) otimizado para reações com sonda TaqMan assay® (Tabela 5) e contendo a AmpliTaq Gold DNA polimerase.

Tabela 5. Sondas alvos utilizadas na reação de RT-qPCR

Símbolo	Nomenclatura	Cromossomo	Referência Sonda
<i>POLH</i>	DNA polymerase eta	6p21.1	Hs00197814_ml
<i>POLL</i>	DNA Polymerase lambda	10q24.32	Hs00203191_ml
<i>REV3L</i>	DNA directed polymerase zeta catalytic subunit	6q21	Hs00161301_ml
<i>POLN</i>	DNA polymerase nu	4p16.3	Hs00394916_ml
<i>POLQ</i>	DNA polymerase theta	3q13.33	Hs00981375_ml
<i>POLI</i>	DNA polymerase iota	18q21.2	Hs00969214_ml
<i>POLK</i>	DNA polymerase kappa	5q13.3	Hs00211965_ml
<i>REVI</i>	DNA directed polymerase	2q11.2	Hs01019768_ml
<i>PCNA</i>	Proliferating cell nuclear antigen	20p12.3	Hs00427214_ml

Os preparos e armazenamentos dos materiais foram realizados de acordo com as instruções do fabricante, excetuando o volume final de cada reação otimizado em 10µL. Para cada reação foram utilizados 5,0µL de TaqMan PCR Master Mix, 0,5µL de sonda TaqMan assay® e 2,5µL de cDNA (diluído 1:5). Após esta etapa, as placas das reações foram

centrifugadas por 1 minuto a 1000 rpm.

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

Todas as etapas do procedimento descrito foram realizadas com as amostras imersas em gelo com pouca exposição à luz. Cada amostra foi avaliada em duplicata e foram consideradas para análise somente as amostras cujas diferenças de amplificação não excederam a 0,8 ciclos ($\Delta Cq \leq 0,8$) 52 (VANDESOMPELE et al., 2002).

As duplicatas das amostras que apresentaram diferenças maiores que um ciclo e meio, mesmo após repetição do experimento, foram desconsideradas. Em todas as placas foram realizados controles negativos (NTC) das reações para todos os genes estudados sendo que, para estas reações, foram adicionados 2,5µL de água no lugar da amostra de cDNA. Todas as reações que mostraram amplificação para qualquer um dos controles negativos foram desconsideradas.

3.4.5 Definição dos genes endógenos utilizados nas análises dos dados de RT-qPCR

Para validar a estabilidade dos nível de expressão dos genes candidatos a controles endógenos foram utilizados quatro genes referência: β 2-microglobulina (B2M), *Ubiquitina C* (UBC), *Gliceraldeído fosfato desidrogenase* (GAPDH) e *Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1* (HPRT1) (Tabela 6).

Tabela 6. Sondas dos endógenos utilizadas na reação de RT-qPCR

Símbolo	Nomenclatura	Referência Sonda
<i>HPRT1</i>	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase	Hs02800695_ml
<i>UBC</i>	Ubiquitina C	Hs01871556_ml
<i>B2M</i>	Beta 2-Microglobulina	Hs00187842_ml
<i>GAPDH</i>	Gliceraldeído fosfato desidrogenase	Hs02786624_ml

Para a escolha do par de genes de referência mais estável, foi calculado o desvio padrão de cada gene endógeno com base em valores brutos (Cq - quantification cycle). Entende-se como gene endógeno mais estável, aquele ou aqueles que obtiverem o menor valor de desvio padrão.

Após a análise do desvio padrão, foi realizado um cálculo de coeficiente de correlação de Pearson para cada par de genes de referência candidatos. Em seguida, foi feita a média geométrica de todos os genes, conhecida como média de tendência central (INDEX), e feita correlação de Pearson de cada gene, separadamente, com o INDEX obtido.

Os genes de referência que apresentaram menor valor de desvio padrão e maior correlação entre si e com o valor INDEX ($r > 0,7$) (VANDESOMPELE et al, 2002) foram considerados os mais estáveis. Por fim, para este estudo, obtivemos que os genes mais estáveis nas amostras de cDNA utilizadas foram de *Ubiquitina* e o *Gliceraldeído fosfato desidrogenase* para os grupos de SMD, agricultores e controles saudáveis.

3.4.6 – Validação da qualidade e estabilidade no nível de expressão das amostras de cDNA avaliadas

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

Neste sentido, iniciamos este estudo com um total de 66 amostras de cDNA oriundas de medula óssea dos agricultores e 12 amostras cDNA provenientes dos controles saudáveis, mantendo-se ao fim, somente com 54 amostras de agricultores e 06 amostras de controles saudáveis.

3.5 Variáveis analisadas

As variáveis analisadas neste estudo foram subdivididas em:

❖ **Agricultores**

- Grupo: Grande Produtor e Agricultura Familiar
- Tempo de Exposição Agrotóxico: <5 anos, 5-12 anos, >12 anos
- Exposição a Organofosforados: Sim e Não
- Exposição a Glifosato: Sim e Não
- Exposição a Paraquat: Sim e Não
- Cariótipo Agricultores: Normal e Alterado

❖ **Grupos do Estudo**

- Grupo: SMD, Grande Produtor, Agricultura Familiar e Controles Saudáveis

4.5 Análises Estatísticas

Os resultados referentes às análises do nível de expressão gênica foram analisados com base no valor de cada Cq (quantitative cycle), para cada amostra de cDNA (em duplicata). Para normalizar os valores de Cq, de forma a considerar diferenças causadas por quantidades distintas de cDNA utilizadas nas reações, o Cq determinado para uma amostra foi subtraído da média geométrica dos Cq's dos genes constitutivos utilizados da mesma amostra, gerando assim os valores de ΔCq e, conseqüentemente, de $2^{-\Delta Cq}$ (LIVAK et al, 2001; SCHMITTGEN; LIVAK, 2008).

Os dados sobre o nível de expressão gênica (valores de $2^{-\Delta Cq}$) foram expressos em média \pm desvio padrão (SD), com intervalo de confiança (CI) (máximo e mínimo), a fim de determinar a possível associação entre o nível de expressão dos genes frente cada variável analisada. O nível de significância estatística utilizado foi de (p-valor <0,05).

Os testes de Skinner's/Kurtosis e Shapiro-Wilk foram utilizados para verificar se os dados de cada variável analisada apresentavam-se com distribuição normal (O primeiro para variáveis com mais de 50 casos e o segundo para variáveis com menos de 50 casos). Os valores de outliers

foram retirados (quando ocorreram), por não representarem os resultados que o estudo tinha o objetivo de generalizar.

Os dados com distribuição normal foram analisados através dos seguintes testes paramétricos: t de Student, para a comparação da média entre dois grupos, e teste de *One-way* ANOVA para a comparação das médias em variáveis com mais de dois grupos. As variáveis que não possuíam distribuição normal foram analisadas através dos seguintes testes não paramétricos: Mann–Whitney para a comparação da mediana entre dois grupos, e teste de Kruskal-Wallis para a comparação da mediana em variáveis com três ou mais grupos.

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

O teste de correlação de Pearson foi utilizado para a obtenção dos valores de r e r square (r^2) que demonstra a influência do nível de expressão de um dado gene sobre o outro na população avaliada buscando demonstrar se tais genes são regulados pelo mesmo mecanismo molecular.

5. RESULTADOS

5.1 Caracterização dos grupos

O número total amostral do estudo foi de 146 casos, compreendendo 86 pacientes para o grupo de SMD, 54 trabalhadores agrícolas expostos a agrotóxicos e 06 controles voluntários saudáveis (Tabela 7). Em relação a variável gênero, os casos com SMD apresentaram uma leve predominância dos indivíduos do sexo feminino com 52,3% casos (45/86), já o grupo dos agricultores foram compostos predominantemente por indivíduos do sexo masculino com 94,4% trabalhadores rurais (51/54), enquanto o grupo controle apresentou um predomínio de indivíduos do sexo feminino com 83,2% (5/6) (Tabela 7).

Em relação a idade, para o grupo SMD, a média de idade foi de 66,3 anos (15-92), enquanto para o grupo de agricultores foi observado uma média de idade de 39,9 anos (20-65) e para os casos controles 76 anos (55-88) (Tabela 7).

Tabela 7. Características gerais do três grupos

	SMD	Agricultores	Controles
Grupo	86	54	06
Gênero			
Masculino	45	51	01
Feminino	41	03	05
Média de idade (mínimo-máximo)	66,3 anos (15-92)	39,9 anos (20-65)	76 anos (55-88)

5.2 Caracterização dos agricultores

Foram incluídos neste estudo 54 agricultores residentes da região de Limoeiro do Norte - CE, sendo estratificados em dois grupos a partir do modelo de produção que estavam inseridos. O grupo grande produtor (trabalhadores do agronegócio) foi composto por 70,4% (38/54) do número total de agricultores, enquanto o grupo da agricultura familiar (pequenos produtores) representaram 29,6% (16/54) dos casos (RIGOTTO, 2010).

Em relação a variável gênero, tanto no grupo grande produtor como na agricultura familiar foi observado um grande predomínio de indivíduos do sexo masculino,

correspondendo a 94,8% (36/38) e 93,8% (15/16) dos trabalhadores respectivamente. Quanto a média de idade dos agricultores, os trabalhadores do agronegócio apresentaram média de 38,2 anos (20-60 anos), enquanto os que compunham os pequenos produtores observou-se uma média de 43,7 anos (30-65 anos) (Tabela 8).

Em relação ao estilo de vida, foi avaliado o consumo de álcool e o tabagismo dos trabalhadores. Foi observado que nos dois grupos apenas 14,9% (8/54) apresentavam o hábito de fumar, sendo um predomínio quase total do grupo do grande produtor com 87,3% (7/8) dos fumantes. Observamos que nos dois grupos, a grande maioria do trabalhadores rurais não tinham o hábito de ingerir bebidas alcólicas, onde apenas 5,6% (3/54) de todos os agricultores realizavam o consumo de algum tipo de bebida (Tabela 8).

O histórico de câncer na família dos agricultores foi reportado em 23,7% (9/38) dos casos familiares no grupo do grande produtor e 31,3% (5/16) dos casos na agricultura ecológica (Tabela 8).

Em relação ao resultado do cariótipo, foi observado pelo menos uma alteração cromossômica em 18,6% (10/54) entre os dois grupos expostos, sendo o grande produtor, correspondendo aos agricultores com maior prevalência de anomalias cromossômicas com 70% (7/10) (Tabela 8 e 10).

Tabela 8. Características dos trabalhadores rurais dos dois grupos avaliados no estudo

Variáveis	Grande Produtor	Agricultura Familiar
Média de idade	38,2	43,7
(mínimo-máximo)	(20-60)	(30-65)
Gênero		
Feminino	2	1
Masculino	36	15
Fumantes		
Sim	7	1
Não	31	15
Etilistas		
Sim	2	1
Não	36	15
Histórico de Câncer		
Sim	9	5
Não	29	11

Cariótipo		
Normal	9	3
Alterado	7	3

A maioria dos trabalhadores foram expostos a agrotóxicos por mais de 12 anos, seja esse contato na hora do preparo, na mistura ou na pulverização dos pesticidas. Nos dois grupos, 31,5% (17/54) dos agricultores foram expostos por mais 12 anos, e 18,6% (10/54) dos trabalhadores agrícolas tiveram contato por tempo igual ou menor que de 12 anos (Tabela 9).

Em relação ao tipo de contato dos agricultores com os pesticidas, observou-se que tanto o grupo grande produtor como a agricultura familiar apresentaram um contato indireto mais elevado correspondendo a 63,2% (24/38) e 62,5% (10/16) respectivamente dos casos. Esta exposição indireta, ocorria tanto após a aplicação do agroquímico como durante o processo de colheita (Tabela 9).

A partir da análise do uso de organofosforados, observou-se que 59,3% (32/54) dos dois grupos utilizavam herbicidas provenientes desta classe, com um predomínio do grupo do grande produtor com 62,5% (20/32) dos trabalhadores. Mais especificamente, sobre aplicação do glifosato observou-se um predomínio da não utilização deste herbicida nos dois grupos correspondendo a 76% (41/54) dos trabalhadores rurais, e quando aplicado, este herbicida era utilizado principalmente pelo grupo grande produtor correspondendo a 16,6% (9/54) dos trabalhadores deste grupo. Foi observado o mesmo predomínio da não utilização em relação ao paraquat, correspondendo entre os dois grupos a 88,9% (48/54) dos trabalhadores, sendo aplicado apenas pelo grupo grande produtor com 11,2% (6/54) dos agricultores (Tabela 9).

Tabela 9. Características relacionadas ao manejo dos agrotóxicos

Variáveis	Grande Produtor	Agricultura Familiar
Tempo de Exposição		
Menos de 5 anos	7	1
5 a 12 anos	2	0
Mais de 12 anos	9	8
Tipo de Contato		
Direto	14	6
Indireto	24	10

Organofosforados		
Sim	20	12
Não	17	1
Glifosato		
Sim	9	4
Não	29	12
Paraquat		
Sim	6	0
Não	32	16

Tabela 10. Descrição sociodemográfica, laboratorial e de exposição dos agricultores incluídos no estudo

Caso	Grupo	Sexo	Idade	Câncer Família	Cariótipo	Organofosforado	Glifosato	Paraquat
1	AF	M	42	S	Ausência de Metáfase	S	N	N
2	GP	M	25	N	Ausência de Metáfase	S	S	S
3	GP	F	52	N	Ausência de Metáfase	S	N	S
4	GP	M	23	N	46,XY[20]	N	N	N
5	GP	M	38	N	Ausência de Metáfase	S	S	N
6	AF	M	37	S	Ausência de Metáfase	-	N	N
7	GP	M	30	-	46,XY[15]	S	N	N
8	AF	F	47	S	Ausência de Metáfase	S	N	N
9	GP	F	20	-	Ausência de Metáfase	N	N	N
10	AF	M	38	-	Ausência de Metáfase	S	N	N
11	GP	M	41	-	Ausência de Metáfase	S	N	N
12	GP	M	56	-	46,XY[26]	N	N	N
13	AF	M	46	S	Ausência de Metáfase	S	N	N
14	GP	M	29	-	46,XY[11]	S	S	N
15	AF	M	32	-	46,XY[10]	S	N	N
16	GP	M	58	S	Ausência de Metáfase	N	N	N
17	GP	M	30	N	Ausência de Metáfase	N	N	N
18	GP	M	24	-	Ausência de Metáfase	N	N	N
19	AF	M	41	-	47,XYmar(4)[3]	-	S	N
20	AF	M	51	N	Ausência de Metáfase	S	N	N
21	AF	M	42	-	Ausência de Metáfase	S	N	N
22	GP	M	29	S	46,XY[20]	N	S	S
23	AF	M	30	-	20~30,XY,+1,+14,+16,+18,+21,+22[5]/45,XY[5]	S	S	N
24	GP	M	50	S	46,XY[30]	S	N	N
25	GP	M	51	-	46,XY,add(4)	S	N	N
26	GP	M	23	S	46~47,XY,add(4)(p16),del(7)(q32)[5]	N	N	N
27	GP	M	44	S	46,XY[7]	S	N	N
28	AF	M	65	-	46,XY[7]	S	N	N
29	GP	M	45	S	44,-20,-21[8]/46,XY[2]	S	N	N
30	GP	M	28	N	Ausência de Metáfase	N	S	S
31	GP	M	36	N	Ausência de Metáfase	S	N	N
32	AF	M	39	-	46,XY[20]	-	N	N
33	GP	M	40	N	Ausência de Metáfase	N	S	S
34	GP	M	40	N	Ausência de Metáfase	S	N	N

35	GP	M	37	S	46,XY,del(11)(q23)[4]/46,XY[4]	N	N	N
36	AF	M	39	-	Ausência de Metáfase	S	S	N
37	GP	M	23	N	Ausência de Metáfase	N	N	N
38	GP	M	49	-	Ausência de Metáfase	N	N	N
39	AF	M	52	N	18~35,XY,-4,-5,-8,-9,-11,-17,-19[3]/46,XY[3]	S	N	N
40	GP	M	38	-	46,XY,add(4)(?q35)[3]/46,XY[16]	N	S	N
41	GP	M	30	N	Ausência de Metáfase	S	N	N
42	GP	M	39	S	Ausência de Metáfase	S	S	N
43	GP	M	23	-	46,XY[10]	-	N	N
44	GP	M	47	N	25,+4[3]/33,+1,+2,+5,+10,+16,+17,+18	S	N	N
45	GP	M	50	N	32~45,-1,-18,-7,-14,-16[cp9]	N	N	N
46	AF	M	48	S	Ausência de Metáfase	S	S	N
47	GP	M	39	N	Ausência de Metáfase	N	N	N
48	GP	M	49	-	46,XY[10]	S	N	N
49	AF	M	51	-	Ausência de Metáfase	N	N	N
50	GP	M	51	-	Ausência de Metáfase	S	S	N
51	GP	M	60	N	Ausência de Metáfase	S	N	N
52	GP	M	33	-	Ausência de Metáfase	S	N	S
53	GP	M	25	S	Ausência de Metáfase	N	N	N
54	GP	M	50	N	46,XY,del(11)(q23)[3]/46,XY[8]	S	N	N

Abreviações: GP, Grande Produtor; AF, Agricultura Familiar; M, Masculino; F, Feminino; S, Sim; N, Não. (-) Ausência de informação

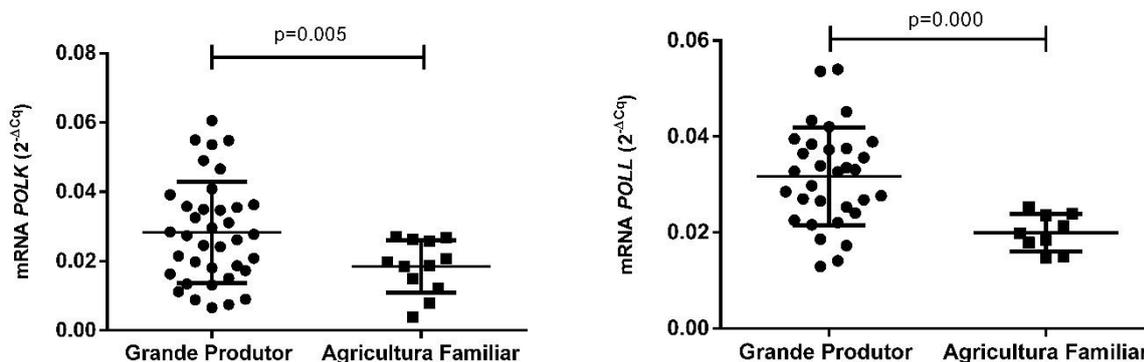
5.3 Análise do nível de expressão gênica por RT-qPCR em amostras de medula óssea dos agricultores

As associações entre os níveis de expressão gênica dos genes *POLH*, *POLL*, *REV3L*, *PCNA*, *POLI*, *REVI*, *POLN*, *POLQ* e *POLK* e as variáveis relacionadas aos agricultores serão apresentadas a seguir. Para melhor compreensão, os resultados serão expostos por variável analisada.

5.3.1 Expressão gênica das Polimerase TLS entre grande produtor e agricultura familiar

Ao avaliarmos os níveis de expressão gênica entre os dois grupos, verificamos que houve um aumento dos níveis de expressão dos genes *POLK* ($p=0.005$) e *POLL* ($p=0.000$) no grupo grande produtor quando comparados com o grupo agricultura familiar (Figura 6).

Figura 6. Nível de expressão dos genes *POLK* e *POLL* em relação aos grupos grande produtor e agricultura familiar.



GENE <i>POLK</i>	Nível de Expressão ($2^{-\Delta Cq}$)					
	GRUPO	Média	Desvio Padrão	IC Inferior	IC Superior	p-valor ‡
	GP	.0282744040	.01459491594	.00315908592	.01632931569	0,005
	AF	.0185302032	.00759292369			

‡Teste *t de Student*. Teste de Levene - Teste de homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$. GP: Grande Produtor; AF: Agricultura Familiar; IC: Intervalo de Confiança.

GENE <i>POLL</i>	Nível de Expressão ($2^{-\Delta Cq}$)					
	GRUPO	Média	Desvio Padrão	IC Inferior	IC Superior	p-valor ‡
	GP	.0316594648	.01015258506	.00718188396	.01614069039	0,000
	AF	.0199981777	.00385246279			

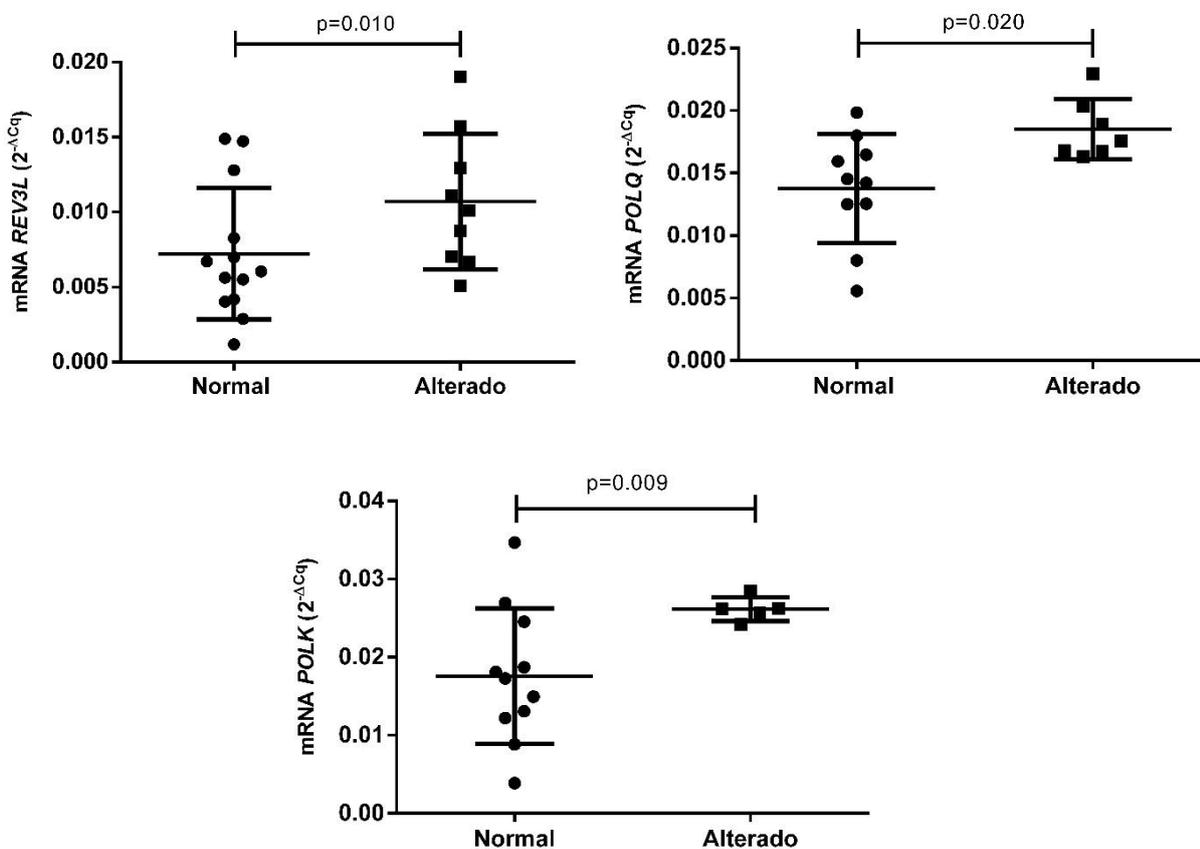
‡Teste *t de Student*. Teste de Levene - Teste de homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$. GP: Grande Produtor; AF: Agricultura Familiar; IC: Intervalo de Confiança.

Não foram identificadas associações significantes entre o nível de expressão dos demais genes avaliados em relação as variáveis Grande Produtor e Agricultura Familiar ($p > 0,05$).

5.3.2 Expressão gênica das Polimerase TLS dos agricultores em relação ao cariótipo

Ao avaliarmos os níveis de expressão gênica em relação ao cariótipo, verificamos que houve um aumento dos níveis de expressão dos genes *REV3L* ($p=0,010$), *POLQ* ($p=0,020$) e *POLK* ($p=0,009$) nos agricultores que apresentaram cariótipo alterado quando comparados com os que apresentaram cariótipo normal (Figura 7).

Figura 7. Nível de expressão do gene *POLQ*, *POLK* e *REV3L* em relação ao cariótipo.



GENE <i>POLK</i>	Nível de Expressão ($2^{-\Delta C_q}$)				
CARIÓTIPO	Média	Desvio Padrão	IC Inferior	IC Superior	p-valor ‡
NORMAL	.0175778305	.00866202134	-	-	0,009
ALTERADO	.0261566262	.00152484650	.01450194566	.00265564565	

‡Teste *t de Student*. Teste de Levene - Teste de homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$. IC: Intervalo de Confiança.

GENE <i>REV3L</i>	Nível de Expressão ($2^{-\Delta C_q}$)				
CARIÓTIPO	Média	Desvio Padrão	IC Inferior	IC Superior	p-valor ‡
NORMAL	.0058323354	.00305033756	-	-	0,010
ALTERADO	.0107146251	.00453396820	.00845386785	.00131071165	

‡Teste *t de Student*. Teste de Levene - Teste de homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$. IC: Intervalo de Confiança.

GENE <i>POLQ</i>	Nível de Expressão ($2^{-\Delta C_q}$)				
CARIÓTIPO	Média	Desvio Padrão	IC Inferior	IC Superior	p-valor ‡
NORMAL	.01376442300 0	.00435946060 61	-	-	0,020
ALTERADO	.01850650971 4	.00241817587 77	.00863589856 21	.00084827486 67	

‡Teste *t de Student*. Teste de Levene - Teste de homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$. IC: Intervalo de Confiança.

Não foram identificadas associações significantes entre o nível de expressão dos demais genes avaliados em relação ao cariótipo ($p > 0,05$).

5.4 Análise do nível de expressão gênica por RT-qPCR em amostras de medula óssea dos pacientes com SMD, agricultores e controles saudáveis

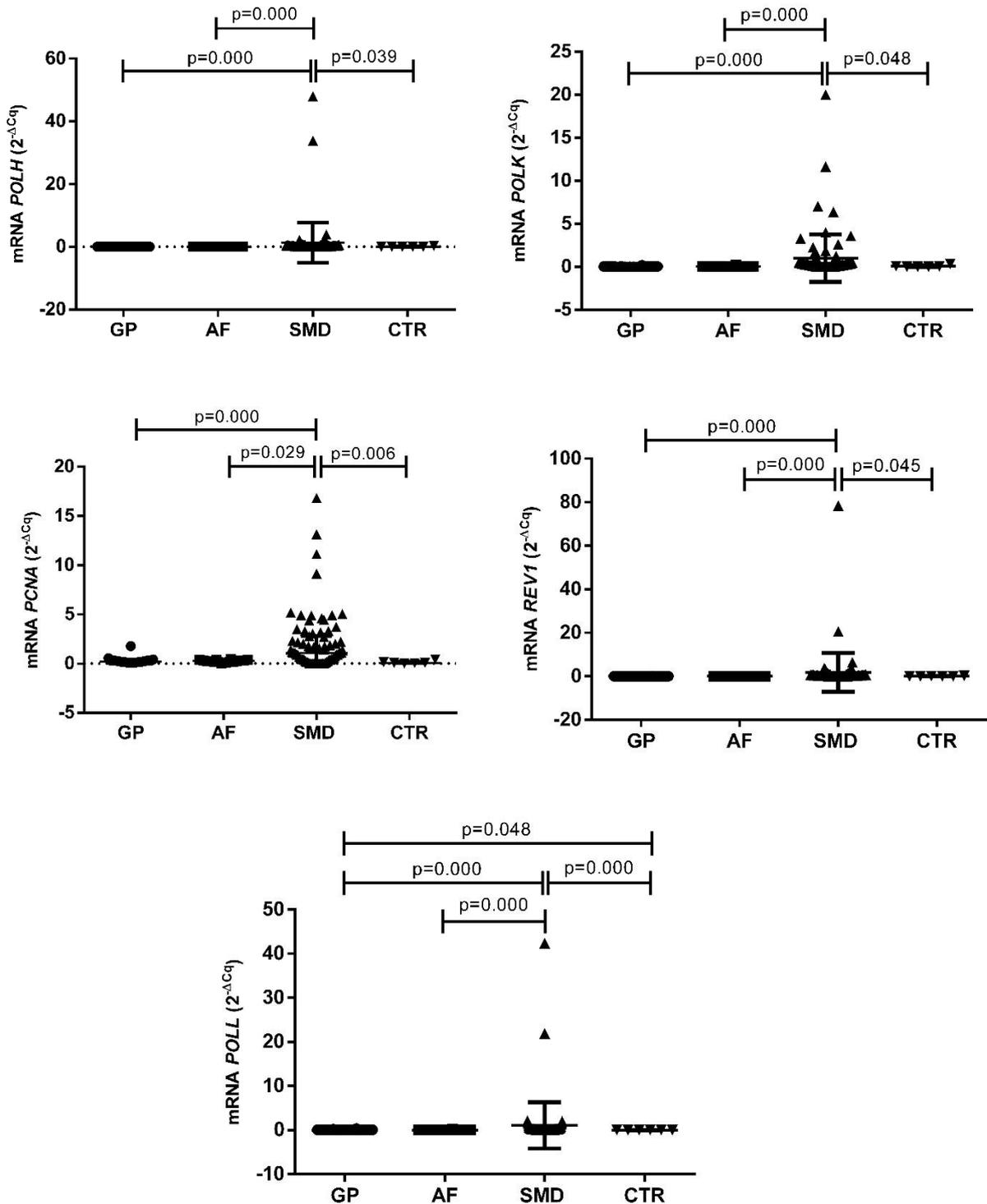
As associações entre os níveis de expressão gênica dos genes *POLH*, *POLL*, *REV3L*, *PCNA*, *POLI*, *REVI*, *POLN*, *POLQ* e *POLK* entre os grupos SMD, agricultores e controles serão apresentadas a seguir.

5.4.1 Expressão gênica das Polimerase TLS em pacientes diagnosticados com SMD, agricultores e controles saudáveis.

Ao avaliarmos os níveis de expressão gênica entre os grupos, verificamos que houve um aumento dos níveis de expressão dos genes *POLH* ($p = 0,000/0,000/0,039$), *POLK*

($p=0.000/0.000/0,048$), *POLL* ($p=0.000/0.000/0.048$), *REVI* ($p=0.000/0.000/0.045$), *PCNA* ($p=0.000/0.029/0.006$) no pacientes com SMD frente aos agricultores e controles saudáveis (Figura 8).

Figura 8. Nível de expressão gênica das DNA polimerases *TLS POLH*, *POLK*, *POLL*, *REVI* e *PCNA* nos grupos SMD, grande produtor, agricultura familiar e controle.



GENE <i>POLH</i>	Nível de Expressão ($2^{-\Delta C_q}$)				
GRUPO	Mediana	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	Teste de Kruskal-Wallis ‡
GP	,00838587	,00776177	,00328713	,04661549	0,000
AF	,00887335	,01559437	,00264241	,06786487	0,000
SMD	,24985710	6,40690895	,00036580	47,93700280	0,000 / 0,000 / 0,039
CONTROLE	,00767185	,10891085	,00470840	,27689840	0,039

‡Kruskal-Wallis: Valor estatisticamente significante para $p \leq 0,05$. GP: Grande Produtor; AF: Agricultura Familiar;

GENE <i>POLL</i>	Nível de Expressão ($2^{-\Delta C_q}$)				
GRUPO	Mediana	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	Teste de Kruskal-Wallis ‡
GP	,03370448	,05390980	,01293042	,30657762	0,000 / 0,048
AF	,02374821	,03601316	,00879037	,15707059	0,000
SMD	,13242210	5,24858556	,00062860	42,37346750	0,000 / 0,000 / 0,000
CONTROLE	,00076320	,00248955	,00010180	,00663360	0,000 / 0,048

‡Kruskal-Wallis: Valor estatisticamente significante para $p \leq 0,05$. GP: Grande Produtor; AF: Agricultura Familiar;

GENE <i>POLK</i>	Nível de Expressão ($2^{-\Delta C_q}$)				
GRUPO	Mediana	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	Teste de Kruskal-Wallis ‡
GP	,02757109	,03108958	,00654778	,19813815	0,000
AF	,02316115	,04265726	,00389742	,18125777	0,000
SMD	,22515890	2,76364471	,00025780	19,99710260	0,000 / 0,000 / 0,048
CONTROLE	,02175325	,13157796	,00025750	,33820960	0,048

‡Kruskal-Wallis: Valor estatisticamente significante para $p \leq 0,05$. GP: Grande Produtor; AF: Agricultura Familiar;

GENE <i>REVI</i>	Nível de Expressão ($2^{-\Delta C_q}$)				
GRUPO	Mediana	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	Teste de Kruskal-Wallis ‡
GP	,00915753	,01973424	,00218905	,12677893	0,000
AF	,00781453	,02094358	,00199306	,08948915	0,000
SMD	,25302983	8,90437590	,00006450	78,43561154	0,000 / 0,000 / 0,045
CONTROLE	,01425765	,09453850	,00182910	,23945090	0,045

‡Kruskal-Wallis: Valor estatisticamente significante para $p \leq 0,05$. GP: Grande Produtor; AF: Agricultura Familiar;

GENE <i>PCNA</i>	Nível de Expressão ($2^{-\Delta Cq}$)				
GRUPO	Mediana	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	Teste de Kruskal-Wallis ‡
GP	,22458497	,27366834	,06434003	1,78515960	0,000
AF	,27901430	,11416439	,03742764	,49119317	0,029
SMD	1,10101234	2,98876627	,00123020	16,81339228	0,000 / 0,029 / 0,006
CONTROLE	,07054735	,14820766	,03561250	,42684670	0,006

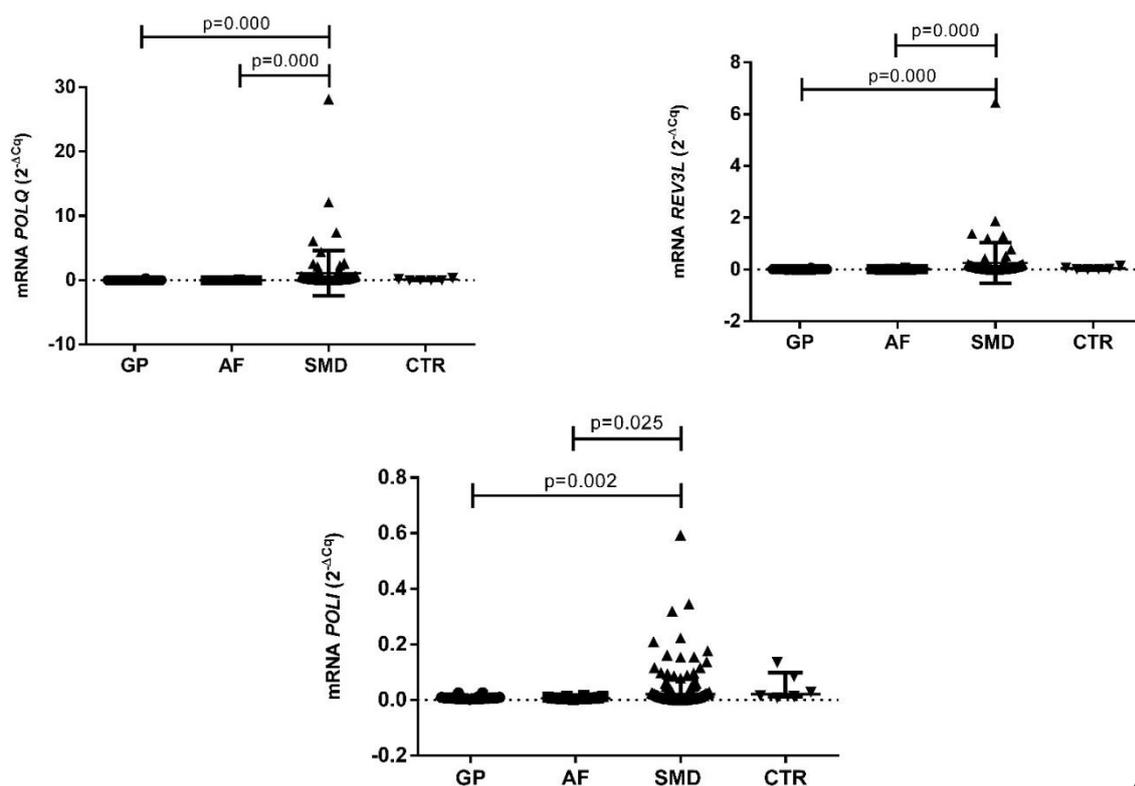
‡Kruskal-Wallis: Valor estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$. GP: Grande Produtor; AF: Agricultura Familiar;

Não foram identificadas associações significantes entre o nível de expressão dos demais genes avaliados em relação aos grupos ($p > 0,05$).

5.4.2 Expressão gênica das Polimerase TLS em pacientes diagnosticados com SMD e agricultores

Ao avaliarmos os níveis de expressão gênica em relação aos grupos, verificamos que houve um aumento dos níveis de expressão dos genes *REV3L* ($p=0.000/0.000$), *POLI* ($p=0.002/0.0025$), *POLQ* ($p=0.000/0.000$) do grupo de SMD em relação a agricultura familiar e grande produtor (Figura 9).

Figura 9. Nível de expressão gênica das DNA polimerases TLS *REV3L*, *POLI* e *POLQ* nos grupos SMD, grande produtor e agricultura familiar.



GENE <i>REV3L</i>	Nível de Expressão ($2^{-\Delta Cq}$)				
GRUPO	Mediana	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	Teste de Kruskal-Wallis ‡
GP	,00847108	,01030577	,00286739	,06453599	0,000
AF	,00820642	,01418105	,00117546	,06240035	0,000
SMD	,07142325	,78308545	,00052150	6,44964930	0,000 / 0,000

‡Kruskal-Wallis: Valor estatisticamente significante para $p \leq 0,05$. GP: Grande Produtor; AF: Agricultura Familiar

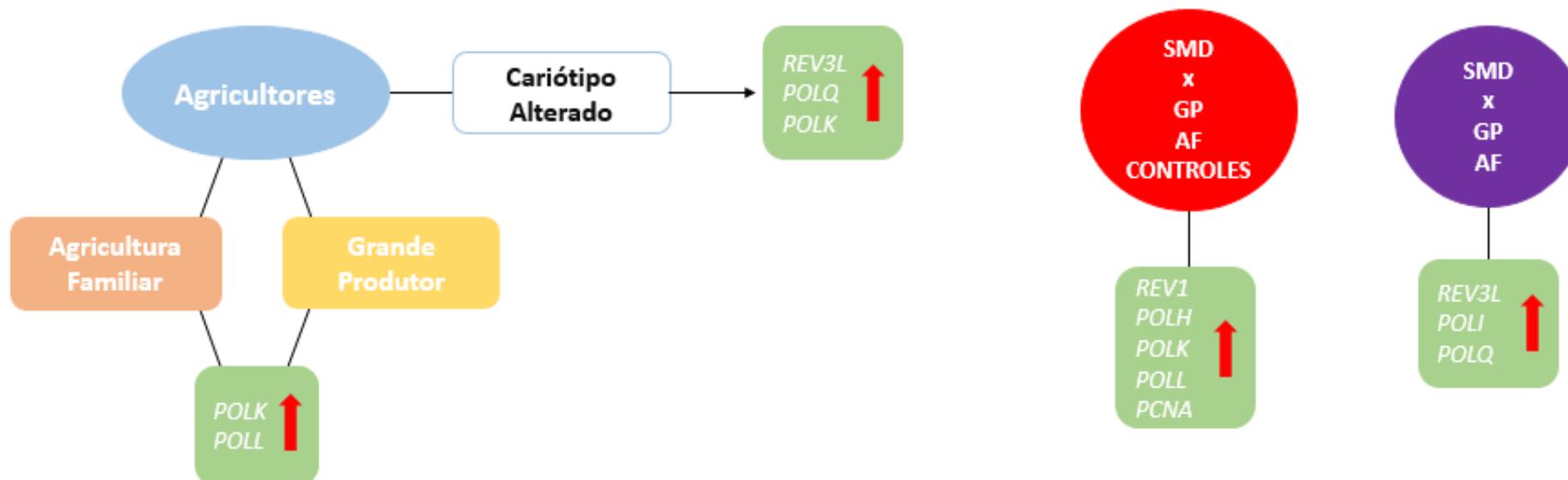
GENE <i>POLI</i>	Nível de Expressão ($2^{-\Delta Cq}$)				
GRUPO	Mediana	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	Teste de Kruskal-Wallis ‡
GP	,00642534	,00499610	,00275552	,02594182	0,002
AF	,00625398	,00379590	,00147979	,01598782	0,025
SMD	,02147890	,09615281	,00005280	,59338320	0,025 / 0,002

‡Kruskal-Wallis: Valor estatisticamente significante para $p \leq 0,05$. GP: Grande Produtor; AF: Agricultura Familiar

GENE <i>POLQ</i>	Nível de Expressão ($2^{-\Delta Cq}$)				
GRUPO	Mediana	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	Teste de Kruskal-Wallis ‡
GP	,01898501	,04631884	,00604804	,29415003	0,000
AF	,01672412	,02383060	,00354117	,10727413	0,000
SMD	,20259097	3,50208471	,00017088	28,15724672	0,000

‡Kruskal-Wallis: Valor estatisticamente significante para $p \leq 0,05$. GP: Grande Produtor; AF: Agricultura Familiar

Figura 10. Esquema de caracterização dos principais resultados de expressão avaliados nesse estudo.



5.5 Análises de correlação entre os níveis de expressão dos genes relacionados ao mecanismo de translesão

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

Admitindo-se, valores de “r” de 0,5 a 0,7 para correlação moderada, 0,7 a 0,9 para correlação forte e acima de 0,9 para correlação muito forte. Valores de correlação significativos com $p < 0,05$.

Inicialmente, observou-se que há uma moderada correlação entre os genes *REV3L* e *POLH* ($r=0,620$; $p=0,000$), *POLK* ($r=0,582$; $p=0,000$), *REVI* ($r=0,646$; $p=0,000$), *PCNA* ($r=0,597$; $p=0,000$). Estes dados demonstram que o gene *REV3L* influencia 38,5% ($r^2 = 0,385$) (Figura 11), 33,8% ($r^2 = 0,338$) (Figura 12), 41,7% ($r^2 = 0,417$) (Figura 13) e 35,7% ($r^2 = 0,357$) (Figura 14) dos níveis de expressão dos genes *POLH*, *POLK*, *REVI* e *PCNA*, respectivamente entre os indivíduos expostos a agrotóxicos.

Figura 11. Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes *REV3L* e *POLH* em indivíduos expostos a agrotóxicos.

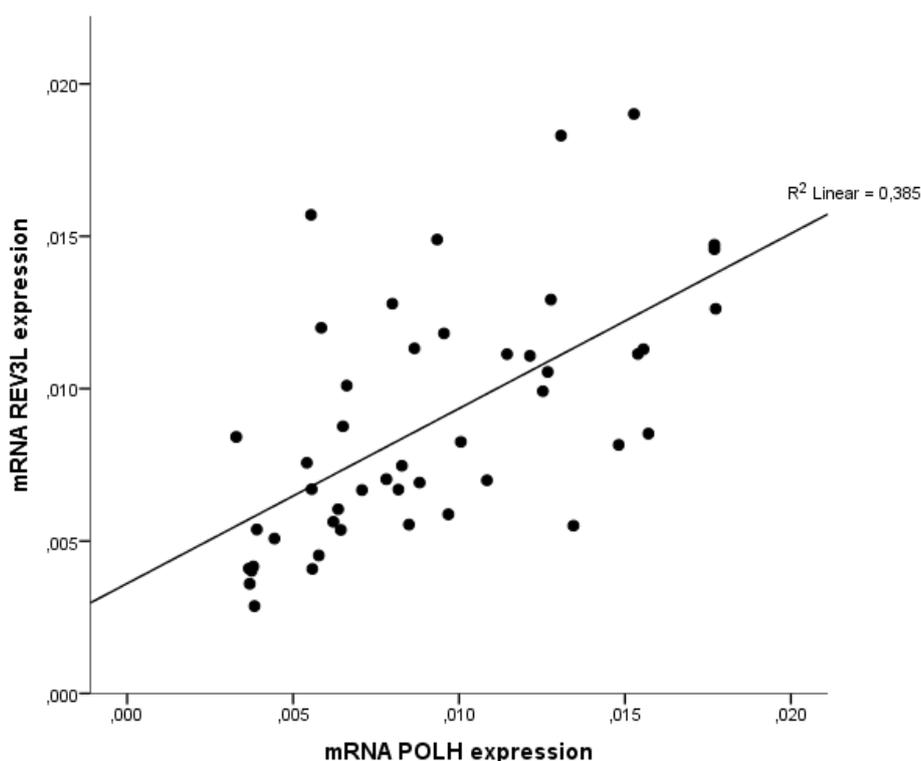


Figura 12. Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes *REV3L* e *POLK* em indivíduos expostos a agrotóxicos.

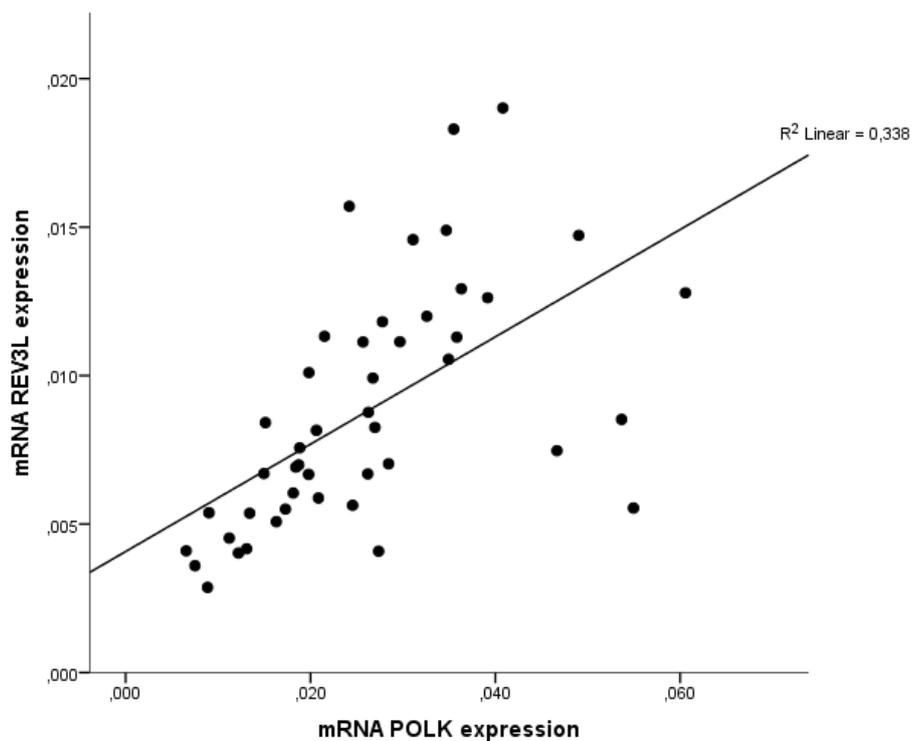


Figura 13. Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes *REV3L* e *REV1* em indivíduos expostos a agrotóxicos

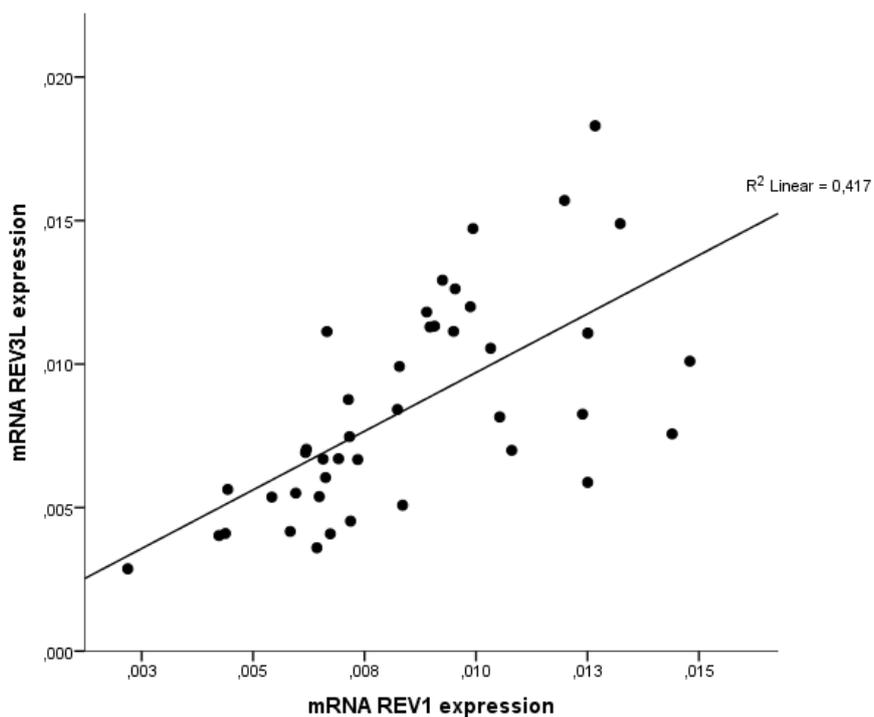
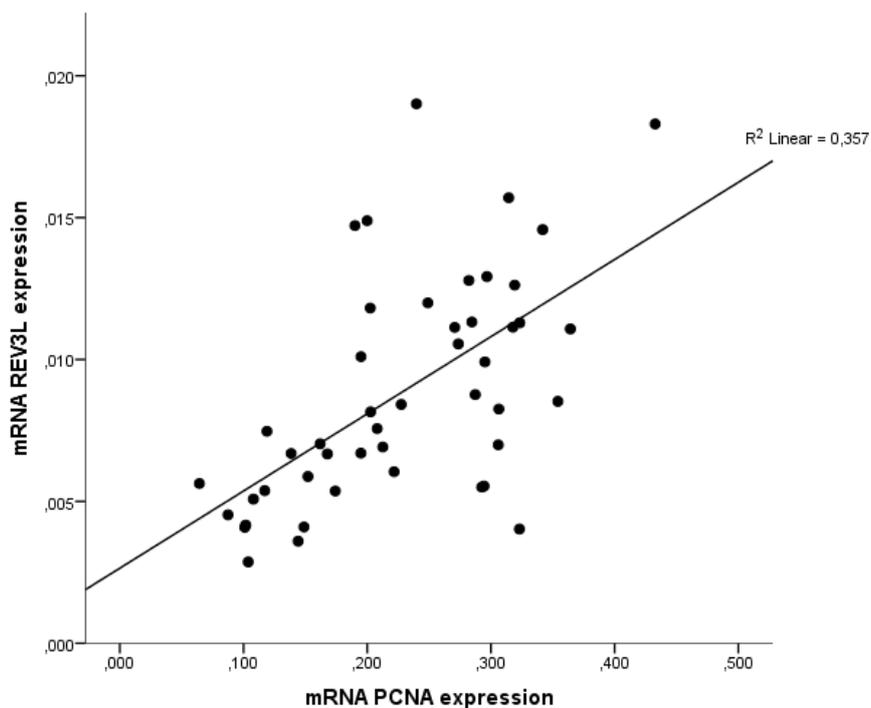
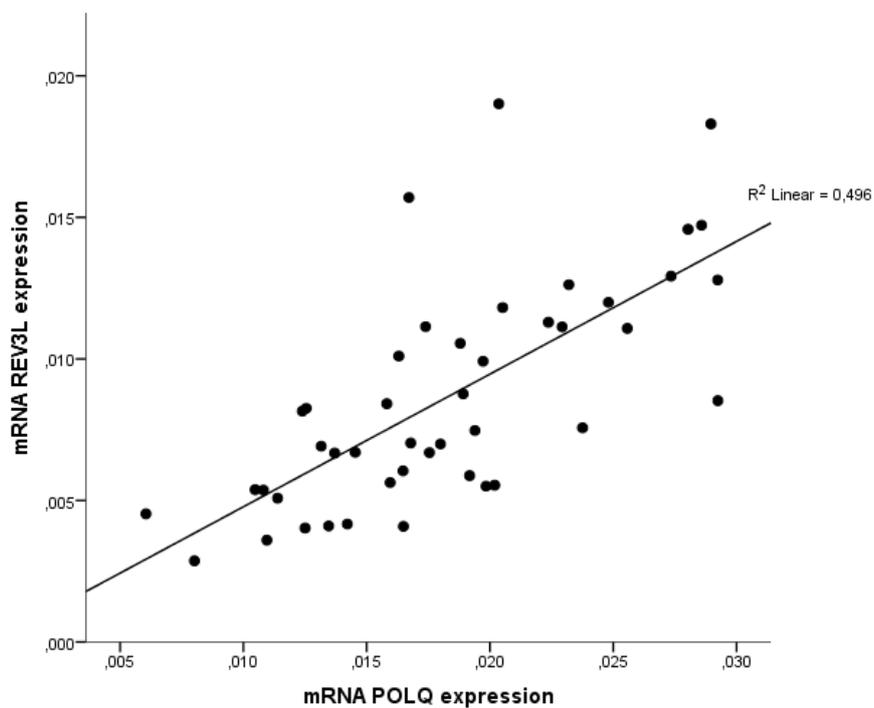


Figura 14. Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes *REV3L* e *PCNA* em indivíduos expostos a agrotóxicos.



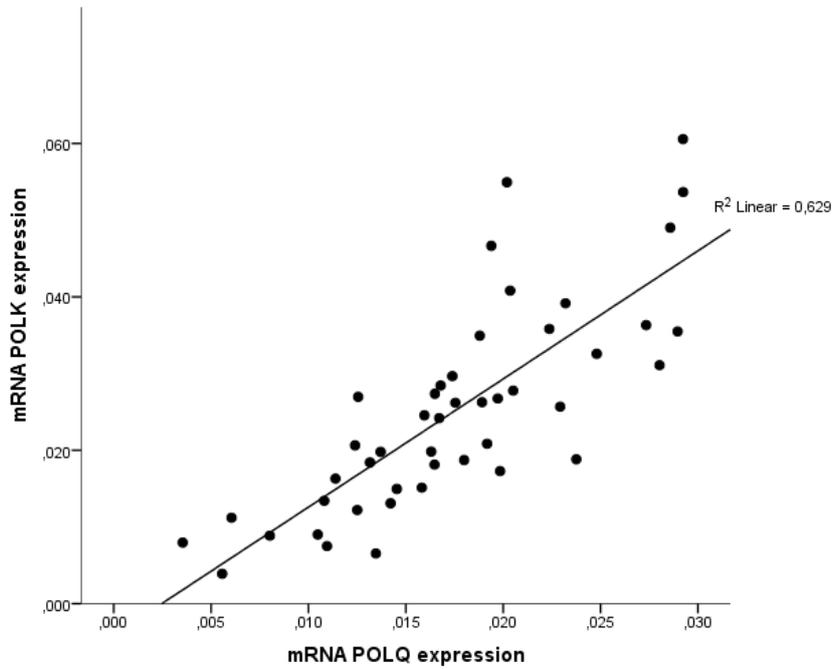
Adicionalmente foi identificado que há uma forte correlação entre os níveis de expressão dos genes *REV3L* e *POLQ* ($r=0,704$; $p=0.000$). Estes dados demonstram que o gene *REV3L* influencia 49,6% ($r^2=0,496$) do nível de expressão de *POLQ* (Figura 15).

Figura 15. Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes *REV3L* e *POLQ* em indivíduos expostos a agrotóxicos.



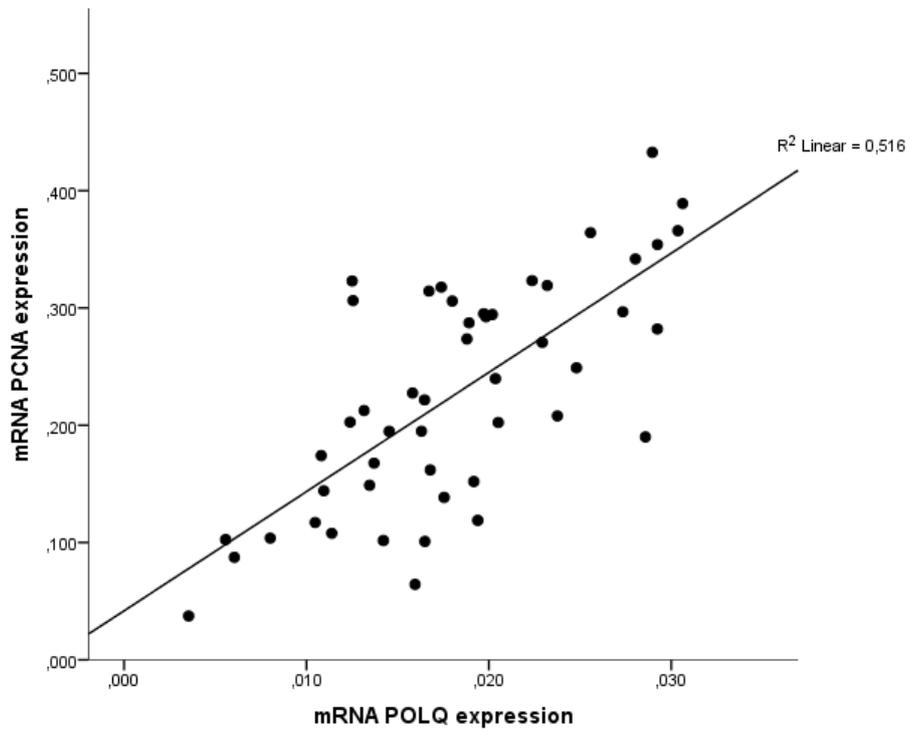
Foi identificado que há uma forte correlação entre os níveis de expressão dos genes *POLK* e *POLQ* ($r=0,793$; $p=0.000$). Estes dados demonstram que o gene *POLK* influencia 62,9% ($r^2=0,629$) do nível de expressão de *POLQ* (Figura 16).

Figura 16. Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes *POLK* e *POLQ* em indivíduos expostos a agrotóxicos.



Foi identificado que há uma forte correlação entre os níveis de expressão dos genes *PCNA* e *POLQ* ($r=0,718$; $p=0.000$). Estes dados demonstram que o gene *PCNA* influencia 51,6% ($r^2=0,516$) do nível de expressão de *POLQ* (Figura 17).

Figura 17. Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes *PCNA* e *POLQ* nos indivíduos expostos a agrotóxicos.



6 DISCUSSÃO

Os biomarcadores, que são definidos como quaisquer substâncias que possam ser utilizadas para identificar a presença de uma doença, são também amplamente utilizados como ferramentas com objetivo de elucidar o desencadeamento de determinados tipos de cânceres (BRUCKER et al., 2019). Desta forma, os biomarcadores, surgem como dispositivo valiosos, onde a detecção de alterações sejam em níveis genômicos ou protéicos, são vislumbres como possíveis marcadores de doença (ALBERTINI et al., 2006; BRUCKER et al., 2019).

Durante o processo evolutivo, o nosso organismo como um todo, desenvolveu diversos mecanismos para manutenção da homeostase celular, através de vários dispositivos, que permitam a estabilidade do material genético, sendo assim, compatível para a manutenção da vida (PILIE, 2018).

As moléculas biológicas são suscetíveis as milhares de reações químicas espontâneas que ocorrem diariamente no organismo, estas reações enzimáticas, apresentam taxas de erro, onde a partir das geração de radicais livres (espécies reativas de oxigênio e nitrogênio), podem ter efeito prejudicial na estrutura da molécula de DNA (BASSIL et al., 2007). Além dos fatores internos, diversos componentes do ambiente, como radiação ultravioleta, produtos químicos (cigarro, poluição, pesticidas) constantemente ameaçam a estabilidade do DNA. Estes agentes são capazes de modificar a estrutura da molécula de DNA, gerando um quadro de instabilidade genômica, uma característica comum de quase todos os cânceres (PEDERSEN et al., 2017).

Para a manutenção do equilíbrio necessário para a sobrevivência e a diversidade do organismo, ao longa da evolução, foi proporcionado a todos os seres vivos, ferramentas com habilidade de remover ou tolerar danos ao DNA, afim de garantir a integridade genômica. Apesar da proteção proporcionada pelos mecanismos de reparo, estes, podem não funcionar de forma correta. Neste cenário, as células desenvolveram habilidades para evitar o dano ou sintetizar lesões passadas, sendo denominadas de mecanismos de síntese de translesão (VAISMAN, 2017; POWERS, 2018). Devido a característica das enzimas de translesão, estas polimerases surgem como candidatas a marcadores biológicos de efeito entre os grupos do estudo, os quais nos dedicamos a analisar neste trabalho.

6.1 Aumento da expressão de *POLK* e *POLL* no grupo grande produtor em relação a agricultura familiar

Os pesticidas são produtos amplamente utilizados na produção agrícola com objetivo de prevenção e controle de pragas visando a redução de perdas do rendimento e manutenção da qualidade do produto. Embora os agrotóxicos sejam desenvolvidos sob certa regulamentação, diversos estudos já demonstraram uma associação positiva dos pesticidas com o desenvolvimento de diversos tipos de câncer (BASSIL et al., 2007; WEICHTAL, MOASES e CHAN, 2012; PLUTH, ZANINI e BATTISTI, 2019).

Indivíduos que trabalham em áreas agrícolas são considerados como grupos de riscos para o desenvolvimento de diversos tipos de doenças, sendo expostos de formas distintas (DAMALAS e ELEFTHEROHORINOS, 2011). Agricultores de pequena produção, apresentam um maior risco de toxicidade, devido às más condições de trabalho e falta de conhecimento dos riscos potenciais aplicação dos pesticidas, enquanto, os grandes produtores ou moradores próximos a regiões agrícolas, podem ter contato a partir da contaminação do ar, comida ou solo (DAMALAS e KOUTROUBAS, 2016).

Avaliamos os níveis de expressão das polimerases TLS dos dois grupos de agricultores expostos aos pesticidas e observamos um aumento da expressão dos genes *POLK* e *POLL* do grupo grande produtor em relação ao agricultor familiar.

Devido à falta de fidelidade e acurácia das polimerases TLS, sua expressão necessita-se de uma regulação cuidadosa, a ponto de qualquer alteração, como um aumento de sua expressão, possa gerar um cenário onde estas enzimas deixem de serem úteis para a homeostase celular, para serem catalisadores do processo de carcinogênese (HOFFMANN E CAZAUX, 2010).

A polimerase lambda, codificada pelo gene *POLL*, é uma enzima multifuncional, apresentando propriedades capazes de atuar em diferentes vias de reparo do DNA, como as BER e NHEJ. No entanto, quando desreguladas, podem ser fontes de instabilidade genética, caracterizando-se também por serem menos fidedignas no processo de transcrição, quando comparada com as polimerases da família Y (LOON, HUBSCHER, MAGA, 2017).

Um estudo do nosso grupo de pesquisa demonstrou que os agricultores que compunham o grupo grande produtor apresentavam uma diminuição da expressão do gene *XRCC5* e *LIG4*. O gene *XRCC5*, que codifica a proteína Ku80, participa do dímero Ku70\Ku80 e o gene *LIG4* é uma DNA ligase, ambos apresentam papéis cruciais na via de NHEJ (FARIAS, 2017).

Nesse contexto, levantamos a hipótese que o acúmulo de lesões que acometem o grupo grande produtor, cause uma sobrecarga as vias de reparo do DNA, tendo como consequência pelas células a ativação das polimerases TLS afim de evitar um quadro de apoptose. Sugerimos que um aumento da expressão das polimerases *POLK* e *POLL* no grupo grande produtor devido a exposição aos pesticidas e as características mutagênicas das TLS sejam preditivas para o desenvolvimento de câncer nos indivíduos deste grupo.

6.2 Aumento da expressão de *REV3L*, *POLQ*, *POLK* dos agricultores com cariótipo alterado

Nos resultados aqui apresentados, avaliamos os níveis de expressão das polimerases TLS dos dois grupos de agricultores expostos aos pesticidas e observamos um aumento da expressão do gene *REV3L*, *POLQ* e *POLK* dos agricultores que apresentavam cariótipo alterado em relação ao cariótipo normal.

A exposição a pesticidas tem sido relacionada a várias doenças humanas como, doenças neurológicas, endócrinas assim como vários tipos de câncer (BORTOLI, AZEVEDO e SILVA, 2009). O estresse oxidativo e danos a molécula de DNA apresentam-se como os principais mecanismos que vinculam a exposição ocupacional com o desenvolvimento destas doenças. O exame citogenético é uma ferramenta bastante valiosa para avaliação da genotoxicidade potencial, a partir da observação de alterações estruturais nos cromossomos (KAUR e KAUR, 2018).

Paz-y-Mino et al. (2012) realizaram exame citogenético a partir do sangue periférico de 41 trabalhadores expostos a pesticidas e 41 indivíduos não expostos, servindo como grupo controle. Como resultado, observaram que a frequência de alterações cromossômicas numéricas foi 30 vezes maior no grupo exposto aos agrotóxicos em relação ao grupo controle (PAZ-y-MINO et al., 2012).

Além de desempenhar sua função de tolerância aos danos, *POLQ* funciona como uma via alternativa de junções não-homologas (altEJ) na ausência ou frente a menor expressão de componentes das vias de reparo de fita dupla. Na Junção de Extremidades mediada por Micro Homologia (MMEJ), com participação de *POLQ*, o reparo de quebras de dupla fita requer micro homologia de 5pb a 25pb para alinhar as extremidades quebradas, antes de torna-las compatíveis e torna-se necessário para garantir a sobrevivência de células com as vias de reparo de HR e NHEJ comprometidas (BENNARDO, 2008). No entanto, essa via é ainda mais propensa a erros, podendo resultar grandes em deleções (BLACK, 2016; MATEOS-GOMEZ,

2015).

Em estudos anteriores, nosso grupo demonstrou que um dos genes relacionados aos mecanismos de reparo de fita dupla do DNA, *BRCA2*, apresentou uma diminuição de expressão em agricultores que apresentavam cariótipo alterado (FARIAS, 2017). Observamos em nossos resultados fortes e moderadas correlações entre *REV3L* com *POLK* e *POLQ*, respectivamente. Demonstrando que um determinado gene influencia a atuação do outro, ou seja, são correlacionáveis podendo participar de uma mesma cascata molecular frente a uma lesão por pesticidas.

Desta forma, acreditamos que o funcionamento incorreto dos mecanismos de reparo, a primeira linha de defesa celular contra agentes genotóxicos, como os pesticidas, leve ao recrutamento das polimerases TLS a fim de evitar o aumento da instabilidade genômica e a apoptose. No entanto, estas polimerases são propensas a erros e potencialmente mutagênicas, o que pode aumentar o risco de desenvolvimento de câncer nestes indivíduos.

Assim, diante dos resultados, conjecturamos que o aumento da expressão gênica das DNA polimerase *REV3L*, *POLQ* e *POLK* estejam atuando como marcadores de prognóstico desfavorável nos agricultores com cariótipo alterado, podendo ser preditivos de desenvolvimento de doença.

Com relação as alterações cromossômicas identificadas neste estudo, foram encontradas deleções no braço longo dos cromossomos 5, 7 e 11 nos indivíduos expostos a agrotóxicos. As anormalidades nos cromossomos 5, 7 e 11 são alterações recorrentes na Síndrome Mielodisplásica e também são detectadas na LMA secundária à quimioterapia (SWERDLOW et al., 2008). Sabemos que o câncer é uma doença multifatorial e que, além de alterações cromossômicas, são necessários passos adicionais para o desenvolvimento da doença, como mutações em genes supressores tumorais, ativação de oncogenes e modificações epigenéticas (APARÍCIO et al., 2013). Ademais de ser ocasionado por múltiplos fatores, a exposição prolongada a produtos tóxicos/mutagênicos é um dos primeiros passos para desenvolvimento de câncer. Dessa forma, diante dos achados citogenéticos e moleculares encontrados neste trabalho, acreditamos que os indivíduos expostos a agrotóxicos devem ser biomonitorados frequentemente quanto à presença de alterações cromossômicas.

6.3 Aumento da expressão dos genes *REVI*, *POLH*, *POLK*, *POLL* e *PCNA* do grupo SMD em relação aos agricultores e controles.

Nos resultados aqui relatados, avaliamos a expressão de controles saudáveis, indivíduos

expostos a agrotóxicos, o grande produtor e o agricultor familiar, frente a pacientes portadores de SMD, demonstrando que os pacientes com câncer apresentaram um aumento de expressão das DNA Polimerases *PCNA*, *REVI*, *POLH*, *POLK*, *POLL* em relação aos dois grupos. Diversos estudos já relataram a superexpressão das polimerases TLS associada a inúmeros tipos de câncer, como por exemplo, *REVI* com câncer de próstata (KIM et al., 2016), *POLH* com câncer de pulmão (CEPPI et al., 2009), *POLK* e câncer de colorretal (LAPORTE et al., 2019).

REVI é uma polimerase de translesão pertencente à família Y, que diferente das outras enzimas TLS, desempenha um papel de recrutamento de outras enzimas de translesão da mesma família, *POLH* e *POLK* que realizam a inserção e extensão de forma mais propensa a erros dos nucleotídeos opostos as lesões (YAMANAKA et al., 2017).

Shtylik-Tsaalbi et al. (2009) investigaram a partir de modelos murinos com alelos hipomórficos *REVI*^{B^B} e com defeito na via NER, o desenvolvimento de um câncer de pele induzido por raios UVs. Como esperado, a exposição da pele destes camundongos à UV, induziu hiperplasia inflamatória grave, proporcionando promoção tumoral. Como resultado final, observaram que o defeito na função do REV1, levou uma redução do início do câncer de pele, porém aumentou o tamanho do tumor, acelerando assim, o processo de tumorigênese (SHTYLIK-TSAALBI et al., 2009).

POLH e *POLK* são enzimas pertencentes a família Y das DNA polimerases TLS. Apesar da capacidade única da polimerase *POLH* de transpassar lesões por radiação UV de forma fidedigna, as polimerases desta família, são conhecidas por incorporação errôneas de nucleotídeos frente a lesões no DNA, acarretando em um aumento do processo mutagênico. (VAISMAN e WOODGATE, 2017, STERN et al, 2019).

Cepi et al. (2009) realizaram a comparação dos níveis de expressão gênica de *POLH* entre grupos que compreendia 72 biópsias de pacientes com câncer de pulmão sob tratamento por quimioterápicos, 50 amostras de tecido pulmonar normal e cinco linhagens celulares de câncer de pulmão. Como resultado, observaram que um elevado nível de expressão de *POLH* estava associado a menor sobrevida no grupo de pacientes sob tratamento de quimioterápicos, assim, indicando que está polimerase possa ser um marcador preditivo de investigação em pacientes sob tratamento (CEPPI et al., 2009)

Ao verificarmos o aumento de expressão do *PCNA* e *REVI* podemos reforçar a associação entre estas duas enzimas que desempenham um papel de controle e organização das TLS. A *PCNA* ao deparar-se com uma lesão, torna-se monoubiquitinada (*PCNA*-mUB) na forquilha de replicação. Desta forma, estudos demonstram que ao atingir essa conformação, há uma vantagem da sua interação com as polimerases da família Y, auxiliando as TLS no acesso ao

local da lesão (WATERS et al., 2009, WANG et al., 2016)

Diante dos resultados, contrastados com a literatura, observamos que nível o expressão gênica mais elevada das DNA Polimerases PCNA, *REVI*, *POLH*, *POLK*, *POLL* do grupo SMD em relação aos agricultores e controles do estudo, estejam associadas ao maior acúmulo de lesões refratárias dos pacientes com SMD, recrutando as polimerases TLS, como uma última saída frente aos danos ao DNA. Apesar da maioria dos agricultores do estudo apresentarem tempo de exposição aos pesticidas superior a 12 anos, podemos conjecturar um cenário onde as vias de reparo de fita simples e dupla do DNA consigam agir frente as lesões, não sendo necessária a ativação, até este momento de exposição das polimerases TLS. Desta forma, devido as interações entre PCNA e as polimerases da família Y e situações onde as vias de reparo BER e NHEJ não consigam reparar as lesões, recrutando *POLL*, hipotetizamos que através da características mutagênicas das TLS, o aumento de expressão destes genes possam estar relacionadas com o processo de fisiopatologia da SMD.

6.4 Aumento da expressão dos genes *POLQ*, *POLI* e *REV3L* dos pacientes com SMD em relação aos agricultores

Identificamos que os pacientes portadores da SMD apresentaram um aumento da expressão das polimerases TLS *POLQ*, *POLI* e *REV3L* frente ao grupo dos agricultores.

A superexpressão do *POLQ* é observada em um grande número de cânceres, onde cerca de 70% dos cânceres de mama apresentam uma superexpressão cinco vezes maiores do *POLQ*, associada a um prognóstico desfavorável (WANG et al., 2019). Higgins et al. (2010) avaliaram os resultados clínicos de duas séries de pacientes com os níveis de expressão do gene *POLQ*, como resultado, observaram uma superexpressão do *POLQ* em um número significativos de tumores, estando também relacionada com um aumento do tamanho do tumor, ambos os quais estão associados a resultados clínicos desfavoráveis (HIGGINS et al., 2010).

A subunidade Rev3 interage com a Rev7 formando a polimerase zeta, codificada pelo gene *REV3L*. É uma polimerase com fidelidade moderada que apresenta a habilidade única de se estender através da fita molde, atuando em conjunto com outras polimerases TLS. A maioria das polimerases apresentam dificuldade de extensão, por não se ligarem adequadamente a fita lesionada. Neste cenário, *REV3L* apresenta um papel chave na síntese de translesão ao evitar que a célula entre em apoptose. Porém, devido a sua falta de fidelidade, pode induzir uma mutação que seja prejudicial ou não ao organismo (QUINET e LERNER, 2018; MARTIN e WOOD, 2019).

A partir de pesquisas disponíveis na literatura e de nossos resultados observamos que os níveis de expressão gênica mais elevada das DNA Polimerases *POLQ*, *POLI* e *REV3L* demonstrem um estágio de instabilidade genômica nos pacientes com SMD em relação ao grupo dos agricultores do estudo. Desta forma, em relação a exposição aos pesticidas, nas nossas análises podemos conjecturar dois cenários. A exposição aos pesticidas não foi o suficiente para causar grandes lesões ao DNA do grupo dos agricultores até este tempo de exposição, ou os mecanismos de reparo das vias clássicas estão desempenhando seu papel, sem a necessidade de recrutamento das polimerases TLS. Em contra partida, o grupo doente, ao apresentar níveis mais elevados de expressão das polimerases TLS, demonstram um processo lesivo do DNA muito mais avançado. Neste cenário, hipotetizamos que a partir do acúmulo de lesões no grupo doente as polimerases TLS são recrutadas possivelmente devido a ineficiência das vias de reparo de fita simples e dupla. Porém por conta da sua baixa fidelidade e estarem propensa a erros, as enzimas TLS podem estar envolvidas em uma maior acúmulo de mutações no grupo da SMD, relacionando-se com o processo fisiopatológico da doença.

7. CONCLUSÕES

- I. Os níveis de expressão dos genes *POLK* e *POLL* são mais elevados no grupo grande produtor em comparação com agricultura familiar;
- II. O aumento da expressão dos genes *REV3L*, *POLQ*, *POLK* nos agricultores com cariótipo alterado pode estar associado a um aumento da instabilidade genômica como resultado da exposição crônica a pesticidas;
- III. O aumento da expressão dos genes *PCNA*, *REVI*, *POLH*, *POLK* e *POLL* nos pacientes com SMD frente aos agricultores e controles saudáveis podem estar associados com o processo de fisiopatologia desta doença;
- IV. O aumento da expressão dos genes *REV3L*, *POLQ*, *POLI* nos pacientes com SMD frente aos agricultores demonstram um processo de instabilidade genômica avançada no grupo doente e podem estar relacionados com o mecanismo biológico da doença;
- V. Estes resultados suportam a importância da regulação da expressão gênica das DNA Polimerases com atividade TLS no processo de manutenção da estabilidade genômica das células troncos hematopoiéticas. Devido as características das polimerases TLS, estas enzimas surgem como candidatas a possíveis biomarcadores de efeito em indivíduos expostos aos agrotóxicos, além de possivelmente estarem associadas com a fisiopatologia da SMD.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- APARICIO S, CALDAS C. The implications of clonal genome evolution for cancer medicine. **N Engl J Med.** v. 368, p.842-851. 2013.
- ALBERTINI R, BIRD M, DOERRER N et al. The use of biomonitoring data in exposure and human health risk assessment. **Environmental Health Perspectives.**v.114, p.1755–1762,2006.
- AUNAN JR, CHO WC, SOREIDE K. The Biology of Aging and Cancer: A brief overview of shared and divergent molecular hallmarks. **Aging and Disease.** v.8, p. 628-642, 2017.
- AMORIM LCA. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. **Rev.Bras.Epidemiol.** v. 6, p. 158-170, 2003.
- ARONSON JK, FERNER RE. Biomarkers – A General Review. **Curr Protoc Pharmacol.** v. 76, p. 1-9, 2017.
- AIZPURUA-OLAIZOLA O, SASTRE TORAÑO J, FALCON-PEREZ JM et al. Mass spectrometry for glycan biomarker discovery. **TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2018.**
- ANDREOTTI G, KOUTROS S, HOFMANN JN. Glyphosate use and cancer incidence in the agricultural health study. **JNCJ Natl Cancer Inst.** v. 110, 2018.
- ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Nota técnica nº 23 de 2018.
- ALVAREZ V, FRATTINI C, SACRISTÁN MP. PCNA deubiquitylases control DNA damage bypass at replication forks. **Cells Reports.** v.29, p. 1323-1335, 2019.
- ALAVANJA MC, ROSS MK, BONNER MR. Increased cancer burden among pesticide applicators and others due to pesticide exposure. **CA Cancer J Clin.** v. 63, p.120–142, 2013.
- ANDERSEN PL, XU F, XIAO W. Eukaryotic DNA damage tolerance and translesion synthesis through covalent modifications of PCNA. **Cell Res.** v.18, p.162-73, 2008.
- ARANA ME, SEKI M, WOOD RD et al. Low fidelity DNA synthesis by human DNA polymerase theta. **Nucleic Acids Research.** v.36, p. 3847-3856, 2008.
- BARREYRO L, CLON TM, STARCZYNOWSKI DT. Chronic immune response dysregulation in MDS pathogenesis. **Blood.** v.132, p.1553-1560, 2018.
- BRAITHWAITE EK, PRASAD R, SHOCK DD et al. DNA polymerase lambda mediates a back-up base excision repair activity in extracts of mouse embryonic fibroblasts. **J. Biol. Chem.** v.280, p. 18469–75, 2005.
- BRUCKER N, NASCIMENTO SN, BERNARDINI L et al. Biomarkers of exposure, effect and susceptibility in occupational exposure to traffic-related air pollution: A review. **Journal of**

Applied Toxicology.p.1-15,2019.

BENNERDO N, CHENG A, HUANG N et al. Alternative-NHEJ Is a Mechanistically Distinct Pathway of Mammalian Chromosome Break Repair. **Plos Genetics**, 2008.

BORSOI A, DOS SANTOS PRR, TAFFAREL LE. Agrotóxicos: histórico, atualidades e meio ambiente. **Acta Iguazu**. v.3, p. 86-100, 2014.

BASSIL KL, VAKIL C, SANBORN M et al. Cancer health effects of pesticides. v.63,p 1704-1711,2007.

BEAGAN K, McVEY M. Linking DNA polymerase theta structure and function in health and disease. **Cell Mol Life Sci**. v. 73, p. 603-615, 2016.

BEBENEK K, PEDERSEN LC, KUNKEL TA. Structure-function studies of DNA polymerase λ . **Biochemistry**. v.53, p. 2781–92, 2014.

BLACK SJ, KASHKINA E, KENT T et al. DNA Polymerase θ : A Unique Multifunctional End-Joining Machine. **Genes**. 7(9): 67, 2016.

BORTOLI GM, AZEVEDO MB, SILVA LB. Cytogenetic biomonitoring of Brazilian workers exposed to pesticides: Micronucleus analysis in buccal epithelial cells of soybean growers, 2009.

CARNEIRO FF, PIGNATI W, RIGOTTO RM et al. Dossiê ABRASCO – Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Parte 1 - Agrotóxicos, Segurança Alimentar e Nutricional e Saúde. Rio de Janeiro: **ABRASCO**, 2015.

CALLIF RM. Biomarker definitions and their applications. **Experimental Biology and Medicine**, v. 243, p-213-221, 2018.

Centers for Disease Control and Prevention (US); National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion (US); Office on Smoking and Health (US). How Tobacco Smoke Causes Disease: The Biology and Behavioral Basis for Smoking-Attributable Disease: A Report of the Surgeon General. Atlanta (GA): Centers for Disease Control and Prevention (US); 2010. 5, Cancer.

CEPPI, P. et al. Polymerase eta mRNA expression predicts survival of non-small cell lung cancer patients treated with platinum-based chemotherapy. *Clin Cancer Res*, v. 15, n. 3, p. 1039-45, Feb 2009.

COSTA LF, PIRES GLP. Análise histórica sobre a agricultura e o advento do uso de agrotóxicos no Brasil, 2016.

CHANG HHY, PANNUNZIO NR, ADACHI N. Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**. v.18, p.495-506, 2017.

CHUNG YJ et al. Oxidative stress leads to increased mutation frequency in a murine model of myelodysplastic syndrome. **Leukemia Research**. v. 38, p. 95-102, 2014.

CARGO MD, BOWEN MD. Individual risk assessment in MDS in the era of genomic medicine. **Seminars in Hematology**. v. 54, p. 133-140, 2017.

DAMALAS CA, KOUTROUBAS SD. Farmers Exposure to Pesticides: Toxicity Types and Ways of Prevention. **Toxics**, v.4, p 1-10, 2016.

DAMALAS CA, ELEFTHEROHORINOS IG. Pesticide Exposure, Safety Issues, and Risk Assessment Indicators. **Environmental Research and Public Health**.v.8, p.1402-1408, 2011.

FUCHS RP, FUJI S. Translesion DNA Synthesis and Mutagenesis in Prokaryotes. **Cold Spring Harboring Perspectives in Biology**, 2013.

FOZZA C et al. The immune landscape of myelodysplastic syndromes. **Critical Reviews in Oncology Hematology**. v.107, p. 90 – 99, 2016.

GOODMAN MF, WOODGATE R. Translesion DNA Polymerases. **Cold Spring Harb Perspectives in Biology**, 2013.

GANGAT N, PATNAIK MM, TEFFERI A. Myelodysplastic syndromes: Contemporary review and how we treat. **American Journal of Hematology**. v. 91, 2015.

GAZZIERO DLP. Misturas de agrotóxicos em tanque nas propriedades agrícolas do Brasil. v. 33, p. 83-92, 2015.

GUERRA MR, GALLO CVM, MENDONCA GAS. Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. 2005.

HASSERJIAN RP. Myelodysplastic Syndrome Updates. **Pathobiology**. v. 86, p. 7-13, 2018.

HO TV, SCHARER OD. Translesion DNA Synthesis Polymerases in DNA Interstrand Crosslink Repair. **Environmental and Molecular Mutagenesis**. v. 51, p. 552 – 566, 2010.

HAFERLACH T, NAGATA Y, GROSSMANN V et al. Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. **Leukemia**. v. 28, p. 241 -247, 2014.

HAFERLACH T. The Molecular Pathology of Myelodysplastic Syndrome. **Pathobiology**. v.86, p.24-29, 2018.

HIGGINS GS, HARRIS AL, PREVO R. Overexpression of POLQ Confers a Poor Prognosis in Early Breast Cancer Patients. **Oncotarget**. v.1, p.175-184, 2010.

HYNDAMN IJ. Review: the contribution of both nature and nurture to carcinogenesis and progression in solid tumours. **Cancer Microenviron**. v.9, p. 63-69, 2016.

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

HONG H, WANG Q, LI J. Aging, Cancer and Immunity. **J. Cancer**. v. 10, p. 3021-3027, 2019.

IGNATOV AV, BONDARENKO KA, MAKAROVA AV. Non-bulky lesions in human DNA:

the ways of formation, repair, and replication. **Actae Naturae**. v. 9, p. 13-26, 2017.

IBRAHIM YA. A regulatory perspective on the potential carcinogenicity of glyphosate. **Journal of Toxicology and Health**. v. 2, p. 1-10, 2015.

JONAS BA, GREENBERG PL. MDS prognostic scoring systems – past, present, and future. **Best Pract Res Clin Haematol**. v. 28, p 3-13, 2015.

JIN J YU M, HU C et al. Pesticide Exposure as a Risk Factor for Myelodysplastic Syndromes: A meta-analysis based on 1.942 cases and 5.359 controls. **Plos One**. 2015.

KNOBEL, PA. Translesion DNA Polymerases – Translesion DNA synthesis in the context of cancer research. **Research Gate**, 2011.

KIRKELEIT J, RIISE T, BRATVEIT M, MOEN BE. Increased risk of acute myelogenous leukemia and multiple myeloma in a historical cohort of upstream petroleum workers exposed to crude oil. **Cancer Causes Control**. v.19, p.13–23, 2008.

KWIATOWSKA M, RESZKA E, WOZNIAK K. DNA Damage and methylation induced by glyphosate in peripheral blood mononuclear cells (in vitro study). **Food and Chemical Toxicology**. 2017.

KORC M, JEON CYJ, EDDERKAOUI M. Tobacco and alcohol as risk factors for pancreatic cancer. **Best practice & Research Clinical Gastroenterology**, 2017.

KIM Y, HONH J, GIL H. Mixtures of glyphosate and surfactant TN20 accelerate cell death via mitochondrial damage-induced apoptosis and necrosis. **Toxicology in vitro**. v. 27, p. 191-197, 2013.

KIM YS, KIM Y, CHOI JW. Genetic variants and risk of prostate cancer using pathway analysis of a genome-wide association study. **Neoplasma**. v.63, p.629-634, 2016.

KAWAMURA K. DNA polymerase theta is preferentially expressed in lymphoid tissues and upregulated in human cancers. **Int J Cancer**. v.109, p. 9-16, 2004.

KAUR K, KAUR R. Occupational Pesticide Exposure, Impaired DNA Repair, and Diseases. **Indian J Occup Environ Med**. v.22, p.74-81, 2018.

KOKOUVA M, BITSOLAS N, HADJIGEORGIOU GM, et al. Pesticide exposure and lymphohematopoietic cancers: a case-control study in an agricultural region. **BMC Public Health**. v.11, 2011.

LANGIE, S. A. et al. Causes of genome instability: the effect of low dose chemical exposures in modern society. **Carcinogenesis**. v.36, p.61-88, 2015.

LAPORTE GA, LEGUISAMO NM, GLORIA HC. The role of double-strand break repair, translesion synthesis, and interstrand crosslinks in colorectal cancer progression-clinicopathological data and survival. **J Surg Oncol**. 2019

LEE JW, BLANCO L, ZHOU TG. Implication of DNA polymerase λ in alignment-based gap filling for non-homologous DNA end joining in human nuclear extracts. **J. Biol. Chem.** v.279, p.805–811, 2004.

LERRO CC, ANDREOTTI G, KOUTROS S. Alachlor use and cancer incidence in the agricultura health study: na updated analysis. **JNCL J Natl Cancer Inst.** v. 110, p. 950-957, 2018.

LEITER U, EIGENTLER T, GARBE C. Epidemiology of Skin Cancer. **Sunlight, Vitamin D and Skin Cancer**, 2014.

LIVNEH Z, ZIV O; SHACHAR. Multiple two-polymerase mechanisms in mammalian translesion DNA synthesis. **Cell Cycle.** v.9, p.729-735, 2010.

LINARES MA, ZAKARIA A, NIZRAN P. **Prim Care Clin Office Pract.** v.42, p. 645–659, 2014.

LANGE SS, TAKATA K, WOOD. RD. DNA polymerases and cancer. **Nature.** v.11, p. 96-110, 2011.

LOON B, HUBSCHER U, MAGA G. Living on the Edge: DNA Polymerase Lambda between Genome Stability and Mutagenesis. **Chemical Research in Toxicology.** v.30, p. 1936-1941, 2017.

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

LOPEZ-OTIN, BLASCO MA, PARTRIDGE L. The hallmarks of aging. **Cell**, v. 153, p.1194-1217, 2013.

MAYEUX R. Biomarkers: Potential Uses and Limitations. **NeuroRx: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics.** v.1, p.182-188, 2014.

MASLOV AY, VIJG J. Genome instability, cancer and aging. **Biochim Biophys Acta**, 1790: 963-969 2009.

MALABY AW, MARTIN SK, WOOD RD. Expression and Structural analyses of human DNA polymerase (POLQ). **Methods Enzymol.** v. 592, p. 103-121, 2017.

MAGA G, VILLAI G, CRESPIAN E et al. 8-oxo-guanine bypass by human DNA polymerases in the presence of auxiliary proteins. **Nature.** v.447, p. 606–608, 2007.

MA X. Epidemiology of Myelodysplastic Syndromes. **Am J Med.** v.125, 2012.

MARTIN KS, WOOD RD. DNA polymerases zeta in DNA replication repair. **Nucleic Acids Research.** v. 47, p. 8348-8361, 2019.

MILHOME MAL, SOUSA DOB, LIMA FAF et al. Avaliação do potencial de contaminação de águas superficiais por pesticidas aplicados na agricultura do Baixo Jaguaribe - CE. **Eng.**

Sanit. Ambient, v.14, p.363-372.

MARCH MD, BIASIO A. The dark side of the ring: role of the DNA sliding surface of PCNA.

Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology. 2017.

MATEOS-GOMEZ, PA.; GONG, F.; NAIR, N.; MILLER, KM.; LAZZERINI-DENCHI, E.; SFEIR, A. Mammalian polymerase θ promotes alternative NHEJ and suppresses The implications of clonal genome evolution for cancer medicine recombination. **Nature**. v.12; p.254-257, 2015.

MERHI M, RAYNAL H, CAHUZAC E, et al. Occupational exposure to pesticides and risk of hematopoietic cancers: meta-analysis of case-control studies. **Cancer Causes Control**. v. 18, p. 1209–1226, 2008.

MANKE IA, LOWERY DM., NGUYEN A et al. BRCT repeats as phosphopeptide-binding modules involved in protein targeting. **Science**. v.5645, p.636-9, 2003.

MOON AF, GARCIA-DIAZ M, BATRA VK et al. The X Family portrait: Structural insights into biological functions of X Family polymerases. **DNA Repair**. v. 6, p. 1709-1725, 2007

MONTALBAN-BRAVO, G; GARCIA-MANERO, G. Myelodysplastic syndromes: 2018 update on diagnosis, risk stratification and management. **Amb J Hematology**. v.93, p. 129-147, 2018.

MUSSALI-GALANTE, P. et al. Biomarkers of Exposure for Assessing Environmental Metal Pollution: From Molecules to Ecosystems, v.29,n.1, p. 117-140, jan.2013.

MOON AF, GARCIA-DIAZ M, BATRA VK; BEBENEK, K; DAVIS, BJ; ZHONG, X; RAMSDEN D, KUNKEL TA, PEDERSEN LC. Structural insight into the substrate specificity of DNA polymerase. **Nature Structural & Molecular Biology**. v. 14, p. 45-53, 2003.

NAIR M, SANDHU SS, SHARMA AK. Prognostic and Predictive Biomarkers in Cancer. **Current Cancer Drug Targets**. v. 14, p. 477-504, 2014.

NISSE C, HAGUENOER JM, GRANDBASTIEN B, et al. Occupational and environmental risk factors of the myelodysplastic syndromes in the North of France. **Br J Haematol**. v. 112, 927–935, 2011.

NALEJSKA E Prognostic and Predictive Biomarkers. **Molecular Oncology and Genetics**. v.18, 273–284, 2014.

NEGRINI S, GOURGOULIS VG, HALAZONETIS TD. Genomic instability and evolving hallmark of cancer. **Nat Rev Mol Cell Biol**. v. 11, p. 220-228, 2010.

PAPAEMMANUIL, E et al. Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. **Blood**. v.122, p.3616-27, 2013.

PAZ-y-MINO C, BUSTAMANTE G, SÁNCHEZ ME. Cytogenetic Monitoring in a Population

Occupationally Exposed to Pesticides in Ecuador. **Environmental Health Perspectives**. v.110, p.1077-1081, 2011.

POYNTER JN, RICHARDSON M, ROESLER M. Chemical Exposures and risk of acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome in a population based study. **Int J Cancer**. v.140, p. 23-33, 2017.

PEKMEZOVIC T, SUVAJDZIC VUKOVIC N, KISIC D, GRGUREVIC A. A case-control study of myelodysplastic syndromes in Belgrade (Serbia Montenegro). **Ann Hematol**. v.85, p.514-9, 2006.

PLUTH TB, ZANINI LAG, BATTISTI IDE. Pesticide exposure and cancer: an integrative literature review. **Saúde em Debate**. v.43, 2019.

POWERS KT, WASHINGTON MT. Eukaryotic translesion synthesis: Choosing the right tool for the job. **DNA Repair**. v.18, p.30181-2, 2018.

PIGNATI WA, LIMA FANS, DE LARA SS. Distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil: uma ferramenta para a Vigilância em Saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**. v.22, p. 3281-3293, 2017.

PILIÉ, PG.; TANG, C.; MILLS, GB.; YAP, TA. State-of-the-art strategies for targeting the DNA damage response in cancer. **Nat Rev Clin Oncol**. 2018

PEDERSEN B, SSEMUGABO C, NABANKEMA V. Characteristics of pesticide poisoning in rural and urban settings in Uganda. **Environmental Health Insights**.v.11, p.1-8, 2017.

QUINET A, LERNER LK, MARTINS DJ. Filling gaps in translesion DNA synthesis in human cells. **Mutat Res Gen Tox**, 2018.

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

ROBB MA, McINNES PM, CALIFF RM. Biomarkers and surrogate endpoints: developing common terminology and definitions. **JAMA**, v. 315, p.07-08, 2016.

RIGOTTO RM, DA SILVA AGC, FERREIRA JM. Tendências de agravos crônicos à saúde associados a agrotóxicos em região de fruticultura no Ceará, Brasil. **Rev Bras Epidemiologia**. v.16, p.763-73, 2013.

SERRA LS, MENDES MRF, SOARES MVA. Revolução Verde: reflexões acerca da questão dos agrotóxicos. v.1, 2016.

SRAM RJ, BINKOVA B, BESKID O. Biomarkers of exposure and effect - interpretation in human risk assessment. **Air Quality, Atmosphere & Health**. v. 4, p.161-167, 2011.

STRIMBU K, TAVEL JÁ. What are biomarkers? **Curr Opin HIV AIDS**. v.5, p. 463-466, 2010.

SILINS, I.; HÖGBERG, J. Combined Toxic Exposures and Human Health: Biomarkers of Exposure and Effect. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 8, n. 3, p. 629–647, mar. 2011.

SHARMA, S; CANMAN, CE. REV1 and DNA polymerase zeta in DNA interstrand crosslink repair. **Environmental and Molecular Mutagenesis**. v. 53, p. 725 – 740, 2012.

SHANBAG V, SACHDEV S, FLORES J. Family A and B DNA polymerases in cancer: opportunities for therapeutic interventions. **Biology**. p. 1-16, 2018.

STERN HR, SEFCIKOVA J, CHAPARRO EV et al. Mammalian DNA polymerase kappa activity and specificity. **Molecules**.v.2805, p.1-20, 2019.

SCHRENK, D. What is the meaning of ‘A compound is carcinogenic’. **Toxicology Reports**. v.5, p. 504-511, 2018.

SRIVASTAVA A, CREEK DJ. Discovery and validation of clinical biomarkers of cancer: a review combining metabolomics and proteomics. **Proteomics**. 2018.

STROM SS, GU Y, GRUSCHKUS SK et al. Risk factors of myelodysplastic syndrome: a case control study. v. 19, p. 1912-1918, 2005.

SHTYLIK AT, VERSPUY JWA, JANSEN JG. Error-prone translesion replication of damaged DNA suppresses skin carcinogenesis by controlling inflammatory hyperplasia. v.106, p. 21836-21841, 2009.

SHIBATA A, CONRAD S, BIRRAUX J et al. Factors determining DNA double-strand break repair pathway choice in G2 phase. **Embo J**. v.30, p. 1079–1092, 2011.

SWERDLOW SH et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France: IARC Press, 2008.

TANO K, NAKAMURA J, ASAGOSHI K. Interplay between DNA polymerases beta and lambda in repair of oxidation DNA damage in chicken DT40 cells. **DNA Repair** v.6, p.869–875, 2007.

TARAZONA JV, COURT-MARQUES D, TIRAMANI M. Glyphosate toxicity and carcinogenicity: a review of the scientific basis of the European Union assessment and its differences with IARC. **Arch Toxicol**. v. 91, p, 2723-2743, 2017.

TAKATA KI, TOMIDA J, REH S. Conserved overlapping gene arrangement, restricted expression, and biochemical activities of DNA polymerase (*POLN*). **J. Biol Chem**. v.290, p. 2474-93, 2015.

TEIXEIRA DE, PAULA RLG, NAPOLITANO HB. Legislação e Normatização para o

Glifosato no Brasil. **Revista Processos Químicos** v.13, p.105-116, 2019.

THOMPSON LH. Recognition, signaling, and repair of DNA double-strand breaks produced by ionizing radiation in mammalian cells: The molecular choreography. **Mutation Research**. v.751, p.158–246,2012.

VAISMAN A, WOODGATE R. Translesion DNA polymerases in eukaryotes: what makes them tick? **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**. v.52, p. 274-303, 2017.

ZHANG, X; LANCET, JE; ZHANG, L. Molecular Pathology of Myelodysplastic Syndromes: New Developments and Implication in Diagnosis and Treatment. **Leukemia&Lymphoma**, 2015.

VANDESOMPELE J, DE PRETER K, PATTYN F et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biol**, 2002.

VAN BRUGGEN AHC, HE MM, SHIN K et al. Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. v. 616, p. 255-268, 2018.

VICTORIA K, FREEDMAN IG. *De Novo* Myelodysplastic Syndrome and Subsequent Diagnosis of Primary Solid Tumors: Evidence from the National Cancer Institute 2001-2011. **Anticancer Research**. v. 38, p. 5819-5823, 2018.

ZEIDAN M, SHALLIS R, WANG R et al. Epidemiology of myelodysplastic syndromes: Why characterizing the beast is a prerequisite to taming it. **Blood Reviews**. v. 34, p. 1-15, 2018.

ZOU S, SHANG Z, LIU B et al. DNA polymerase iota promotes invasion and metastasis of esophageal squamous cells carcinoma. **Oncotarget**. v.7, p. 32274-32285, 2016.

YAMANAKA K, CHATTERJEE N, HEMANN MT. Inhibition of mutagenic translesion synthesis: A possible strategy for improving chemotherapy? **Plos Genet**. v.13, 2017.

YANG W, GAO Y. Translesion and repair DNA polymerase: diverse structure and mechanism. **Annu Rev Biochem**. v.87, p.239-261, 2018.

YOUSEFZADEH MJ, WOOD RD. DNA polymerase POLQ and cellular defense against DNA damage. **DNA Repair**. v.12, p.1-9. 2013

YU X, CHINI CC, HE M et al. The BRCT domain is a phospho-protein binding domain. **Science**. v. 302, p.639–42, 2003.

WATERS, LS. et al. Eukaryotic translesion polymerases and their roles and regulation in DNA damage tolerance. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 73. p. 134-54, 2009.

WANG Z, SONG Y, LI S. DNA Polymerase theta (POLQ) is important for repair of DNA double-strand breaks caused by fork collapse. **JBC**, 2019.

WANG Z, HUANG M, MA X. REV1 promotes PCNA monoubiquitylation through interacting

with ubiquitylated RAD18. **Journal of Cell Science**. v.129, p. 1223-1233, 2016.

WOOD RD, DOUBLIÉ S. DNA polymerase, double strand break repair, and cancer. **DNA Repair**. v. 44, p. 22-32, 2017.

WOGAN GN, HECHT S, FELTON J. Environmental and chemical carcinogenesis. **Seminars in Cancer Biology**. v. 14, p.473-486, 2004.

WATSON M, HOLAN DM, MAGUIRE-EINSEN. Ultraviolet Radiation Exposure and its impact on skin cancer risk. **Seminars in Oncology Nursing**. 2016.

WILLIAMS AL, WATSON RE, DESESSO JM. Developmental and reproductive outcomes in humans and animals after glyphosate exposure: a critical analysis. **J Toxicol Environ Health B Crit Rev**. v. 15, p. 39-36, 2012.

APÊNDICE A

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

PROJETO: ANÁLISE DOS MECANISMOS DE RESPOSTA A DANOS NO DNA EM INDIVÍDUOS EXPOSTOS A AGROQUÍMICOS E INDIVÍDUOS PORTADORES DE SÍNDROME MIELODISPLÁSICA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

PROJETO: ANÁLISE DOS MECANISMOS DE RESPOSTA A DANOS NO DNA EM INDIVÍDUOS EXPOSTOS A AGROQUÍMICOS E INDIVÍDUOS PORTADORES DE SÍNDROME MIELODISPLÁSICA

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

O abaixo assinado, _____, _____ anos, RG nº _____, declara que é de livre e espontânea vontade que está participando como voluntário do projeto de pesquisa supracitado, de responsabilidade dos pesquisadores Prof. Dr. Ronald Feitosa Pinheiro / Ivo Gabriel da Frota França. O abaixo assinado está ciente de que:

NATUREZA E PROPÓSITO DO ESTUDO

O objetivo da pesquisa é estudar o material genético de pacientes portadores de Síndrome Mielodisplásica gerando dados que favoreçam a uma melhor compreensão do surgimento e evolução clínica desta doença.

PROCEDIMENTOS A SEREM REALIZADOS E RESPONSABILIDADES

A amostra biológica utilizada na presente pesquisa corresponde à medula óssea do indivíduo.

A medula óssea corresponde a um tecido líquido-gelatinoso que ocupa o interior dos

ossos, sendo conhecida popularmente por 'tutano'. Na medula óssea são produzidos os componentes do sangue: as hemácias (glóbulos vermelhos), os leucócitos (glóbulos brancos) e as plaquetas.

A coleta da medula óssea será realizada por médico hematologista experiente com agulha de mielograma mediante punção esternal. O osso do esterno é um osso chato, plano e ímpar localizado no centro do tórax. O osso do esterno é um importante osso hematopoiético, ou seja, de produção das células sanguíneas. É neste osso que é realizada a punção da medula óssea.

Serão coletadas somente 2mL de amostra de medula óssea com o uso de uma agulha específica para aspiração da medula óssea. Todo o procedimento de coleta da medula óssea é realizado mediante administração de anestésico local com duração máxima de 15 minutos.

Durante o procedimento de coleta esternal da medula óssea, pode, raramente, determinar uma equimose (mancha arroxeadas) ao redor do local de onde foi retirada a medula óssea, desaparecendo em poucos dias, e poderá ocorrer dor discreta e de fácil alívio, podendo ser, ocasionalmente, dor de maior intensidade. Excepcionalmente, poderá ocorrer sangramento local. Raramente, pode ocorrer infecção local. Para pacientes com maior sensibilidade dolorosa existe a possibilidade de realizar o procedimento sob anestesia geral. A coleta deste material é necessária, em poucos casos, pela amostra ser insuficiente ou inadequada para análise.

Após o procedimento, serão coletados dados pessoais de sexo e idade, apresentação clínica e checagem dos exames laboratoriais indicados para esclarecimento diagnóstico, tais como: hemograma completo, citologia e histologia (análise microscópica das células) da medula óssea, avaliação para depósitos de ferro medular, bem como outros exames que são feitos mesmo para os pacientes que não participam de nenhuma pesquisa. As amostras coletadas serão processadas e armazenadas no Laboratório de Citogenômica do Câncer (UFC).

É de sua responsabilidade: comparecer nas datas e horários informados e submeter-se aos procedimentos de rotina do serviço.

PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA

Sua participação é voluntária e você tem a liberdade de desistir ou interromper a participação neste estudo no momento em que desejar. Neste caso, você deve informar imediatamente sua decisão ao pesquisador responsável ou a qualquer um membro de sua equipe, sem necessidade de qualquer explicação e sem que isto venha interferir no seu atendimento nesta instituição.

Independentemente de seu desejo e consentimento, sua participação no estudo poderá ser interrompida, em função da ocorrência de qualquer doença que, a critério médico, prejudique a continuação de sua participação no estudo, do não cumprimento das normas estabelecidas, de qualquer outro motivo que, a critério da pesquisadora, seja do interesse de seu próprio bem-estar ou dos demais participantes e, por fim, da suspensão do estudo como um todo.

O Laboratório de Citogenômica do Câncer o manterá informado, em tempo oportuno, sempre que houver alguma informação adicional que possa influenciar seu desejo de continuar participando no estudo e prestará qualquer tipo de esclarecimento em relação ao progresso da pesquisa, conforme sua solicitação.

DIVULGAÇÃO DE INFORMAÇÕES QUANTO À PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO

Os registros que possam identificar sua identidade serão mantidos em sigilo, a não ser que haja obrigação legal de divulgação. Você não será identificado por ocasião da publicação dos resultados obtidos.

Contudo, o(s) monitor (es) do Estudo, auditor(es), membros do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, ou autoridades do(s) órgãos(s) regulamentar(es) envolvido(s) terão direito de ter acesso aos registros originais de dados clínicos de sua pessoa, coletados durante a pesquisa, na extensão em que for permitido pela Lei e regulamentações aplicáveis, como o propósito de verificar os procedimentos e dados do estudo, sem, no entanto, violar a condição de que tais informações são confidenciais.

CONTATOS E PERGUNTAS

Caso surja algum imprevisto ou dúvidas, você deverá entrar em contato solicitar contato direto com o pesquisador responsável pelo estudo: **Dr. Ronald Feitosa Pinheiro (85-981881972)** ou com aluno **Ivo Gabriel da Frota França (85- 998432420)**

Poderá contatar a Secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará - UFC ou no local (Rua Coronel Nunes de Melo, 1000) ou pelo telefone 3366-8344, para apresentar recursos ou reclamações em relação ao estudo.

Somente assine este termo se você tiver a certeza de que recebeu todos os esclarecimentos e informações para decidir conscientemente sobre a sua participação neste estudo.

ASSINATURAS

Autorizo o acesso às minhas informações de saúde aos membros da equipe de pesquisadores, nas condições estabelecidas descritas nos itens acima.

Não renunciei qualquer direito legal que eu venha a ter ao participar deste Estudo.

Eu, por fim, declaro que li cuidadosamente todo este documento denominado **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido** e que, após a assinatura, tive oportunidade de fazer perguntas sobre o conteúdo do mesmo e também sobre o referido estudo, recebendo explicações que responderam por completo minhas dúvidas e reafirmando estar livre e espontaneamente decidido a participar do estudo, ficando munido de uma via do documento assinado pelo pesquisador responsável.

_____/_____/_____
Data

Assinatura do participante da pesquisa

_____/_____/_____
Data

Assinatura do Pesquisador Responsável

_____/_____/_____
Data

Assinatura do Responsável pela aplicação do TCLE