



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

CRISTIANE DA SILVA MONTE

**PERFIL DE METILAÇÃO DE GENES DE REPARO DE FITA DUPLA DE DNA E
SUA CORRELAÇÃO COM A EXPRESSÃO GÊNICA EM PACIENTES COM
SÍNDROME MIELODISPLÁSICA E AGRICULTORES EXPOSTOS A
AGROTÓXICOS**

FORTALEZA

2021

CRISTIANE DA SILVA MONTE

PERFIL DE METILAÇÃO DE GENES DE REPARO DE FITA DUPLA DE DNA E SUA
CORRELAÇÃO COM A EXPRESSÃO GÊNICA EM PACIENTES COM SÍNDROME
MIELODISPLÁSICA E AGRICULTORES EXPOSTOS A AGROTÓXICOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências Médicas.

Orientador: Prof. Dr. Ronald Feitosa Pinheiro.

FORTALEZA

2021

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)

M766p Monte, Cristiane da Silva.

Perfil de metilação de genes de reparo de fita dupla de DNA e sua correlação com a expressão gênica em pacientes com Síndrome Mielodisplásica e agricultores expostos a agrotóxicos. / Cristiane da Silva Monte. – 2021.

116 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Fortaleza, 2021.

Orientação: Prof. Dr. Ronald Feitosa Pinheiro.

1. Síndrome Mielodisplásica. 2. Agricultores. 3. Pesticidas. 4. Metilação do DNA. I. Título.

CDD 610

CRISTIANE DA SILVA MONTE

PERFIL DE METILAÇÃO DE GENES DE REPARO DE FITA DUPLA DE DNA E SUA
CORRELAÇÃO COM A EXPRESSÃO GÊNICA EM PACIENTES COM SÍNDROME
MIELODISPLÁSICA E AGRICULTORES EXPOSTOS A AGROTÓXICOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências Médicas.

Aprovada em: 03/08/2021.

BANCA EXAMINADORA

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

Profa. Dra. Sheila Coelho Soares Lima
Instituto Nacional do Câncer (INCA)

Profa. Dra. Fabiola Traina
Universidade de São Paulo (USP)

Profa. Dra. Cristiana Libardi Miranda Furtado
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Sílvia Maria Meira Magalhães
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

Aos meus pais, Vicente (*in memoriam*) e
Cristina.

Ao meu irmão, Leandro.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me ajudou a superar todos os obstáculos e me trouxe até aqui.

À minha amada família: Vicente (*in memoriam*) e Cristina, por serem os melhores pais que eu poderia ter, e Leandro, que mais do que um irmão, é um parceiro.

Às amigadas que, ao longo da vida, sempre me ajudaram a enxergar meu potencial, vendo em mim até mais do que penso que realmente sou: Thamara e Joelma.

Às companheiras de jornada, com quem dividi alegrias, tristezas e aperreios: Marília e Izabelle.

Aos demais colegas do Laboratório de Citogenômica do Câncer, que me ajudaram com sorrisos, com escuta, com papos científicos, em especial: Daniela (uma amiga inesperada), Bruna, Gabriel, Gabrielle, Manuela, Mayara, Roberta, Sharlene, Lara, Victor e Wesley.

Ao Programa de Carcinogênese Molecular do Instituto Nacional do Câncer, com quem estabelecemos colaboração através das pessoas do Prof. Dr. Luis Felipe Ribeiro Pinto e Dra. Sheila Coelho. Esta, além de ciência e insumos, me ofereceu gentileza, acolhimento, carinho, e até um vinho na despedida. Achei chique!

À grande amiga que encontrei no Rio de Janeiro, Paula Vieira, que me deu muito mais do que uma mãozinha nos experimentos, se deu por completo pra me ajudar em tudo que precisei durante minha passagem pelo INCA, e continua sendo ouvidos e torcida depois que voltei e por mais muito tempo, espero.

Aos demais colegas que me acolheram no INCA, em especial ao Diego Camuzzi, que ajudou no desenho dos meus primers, e à Marina, Jade e Eduarda, pelas conversas terapêuticas na hora daquela coisa antiga que fazíamos: aglomerar para almoçar.

À Dra. Cristiana Libardi, minha co-orientadora não-oficial e salvadora oficial de sufocos acadêmicos.

Ao Dr. Howard Lopes, pelas revisões e sugestões.

À Dra. Fabiola Traina, por aceitar me dar suas colaborações na banca.

À minha primeira orientadora nessa jornada, Dra. Silvia Magalhães, obrigada por estar comigo no início e agora no final.

Ao meu orientador, Dr. Ronald Feitosa, por me receber, direcionar, por ser exemplo de pesquisador e por estar comigo no final dessa história.

À coordenação do PPGCM, principalmente à Ivone e Rita, pela disposição de sempre em nos ajudar a resolver os problemas.

À FUNCAP e Capes, pelo financiamento através de bolsa.

À todos que, direta ou indiretamente, contribuíram com esse trabalho. Vocês sabem quem são!

“De tanto não parar, a gente chegou lá.”

RESUMO

As síndromes mielodisplásicas (SMD) constituem um grupo heterogêneo de doenças clonais hematopoiéticas com padrões aberrantes de metilação descritos para alguns genes, sendo um dos mecanismos epigenéticos mais estudados na fisiopatologia da doença e na influência sobre prognóstico. A exposição a agrotóxicos é um dos fatores predisponentes à SMD, visto que essas substâncias podem induzir desregulação na expressão de genes de reparo, anormalidades cromossômicas e alterações em mecanismos epigenéticos, entre eles a metilação. Este trabalho avaliou o perfil de metilação dos genes atuantes no mecanismo de reparo de fita dupla no DNA (*ATM*, *BRCA1*, *BRCA2*, *LIG4* e *RAD51*) e sua relação com a expressão gênica em amostras de pacientes portadores de SMD, de agricultores expostos a agrotóxicos e de controles sem a doença. Para esta investigação, foi utilizada a técnica de pirosequenciamento, que fornece dados quantitativos de metilação nos sítios CpG. Na análise de metilação em pacientes com SMD, o gene *ATM* apresentou resultados significantes, com metilação maior no sexo masculino ($p = 0,037$), em pacientes com idade até 60 anos ($p = 0,002$) e nos que apresentaram progressão para LMA ($p = 0,016$). Ao compararmos a metilação entre os grupos de agricultores expostos, SMD formas avançadas e controles, detectamos diferenças significativas, com os níveis sempre maiores no grupo controle: *ATM* ($p=0,037$; grupo controle x agricultores $p= 0,000$), *BRCA1* ($p=0,001$; grupo exposto x controle, $p=0,001$; SMD x controle, $p=0,001$), *BRCA2* ($p=0,006$; agricultores x controle, $p=0,027$; SMD x controle, $p=0,004$), *LIG4* ($p=0,009$; agricultores x controle, $p=0,001$; SMD x controle, $p=0,012$) e *RAD51* ($p=0,009$; agricultores x controles, $p=0,047$). A análise de metilação entre os grupos de agricultores não-expostos, SMD de baixo risco e controles também mostrou maiores níveis de metilação no grupo controle, com diferenças significativas para os genes *BRCA1* ($p=0,001$; agricultores x controles, $p=0,001$), *BRCA2* ($p=0,004$; SMD x controles, $p=0,004$; agricultores x controles, $p=0,014$) e *LIG4* ($p=0,001$, em SMD x controles e agricultores x controles). A análise de correlação entre metilação e expressão mostrou uma correlação positiva e forte para o gene *LIG4* no grupo SMD Formas Avançadas ($p=0,006$; $\rho=0,798$) e uma correlação positiva e fraca para o gene *BRCA1* no grupo de agricultores expostos ($p=0,046$; $\rho=0,340$). Esse estudo corrobora o fenômeno da hipermetilação relativa em alguns genes do reparo do DNA em SMD e sugere uma significativa redução de metilação em agricultores expostos a agrotóxicos.

Palavras-chave: Síndrome Mielodisplásica. Agricultores. Exposição a pesticidas. Metilação do DNA.

ABSTRACT

Myelodysplastic syndromes (MDS) constitute a heterogeneous group of clonal hematopoietic diseases with aberrant methylation patterns described for some genes, being one of the most studied epigenetic mechanisms in the pathophysiology of the disease and its influence on prognosis. Exposure to pesticides is one of the predisposing factors to MDS, as these substances can induce dysregulation in the expression of repair genes, chromosomal abnormalities and alterations in epigenetic mechanisms, including methylation. This work evaluated the methylation profile of genes acting in the DNA double-stranded repair mechanism (*ATM*, *BRCA1*, *BRCA2*, *LIG4* and *RAD51*) and its relationship with gene expression in samples from MDS patients, from farmers exposed to pesticides and from controls without the disease. For this investigation, the pyrosequencing technique was used, which provides quantitative data on methylation at CpG sites. In the analysis of methylation in MDS patients, the *ATM* gene was the only one that showed significant results, with higher methylation in males ($p = 0.037$), in patients aged up to 60 years ($p = 0.002$) and in those who progressed to AML ($p = 0.016$). When comparing the methylation between the groups of exposed farmers, SMD advanced forms and controls, we detected significant differences, with levels always being higher in the control group: *ATM* ($p=0.037$; control group x farmers $p= 0.000$), *BRCA1* ($p= 0.001$; exposed x control group, $p=0.001$; MDS x control, $p=0.001$), *BRCA2* ($p=0.006$; farmers x control, $p=0.027$; MDS x control, $p=0.004$), *LIG4* ($p=0.009$; farmers x control, $p=0.001$; MDS x control, $p=0.012$) and *RAD51* ($p=0.009$; farmers x controls, $p=0.047$). The methylation analysis between groups of unexposed farmers, low-risk MDS and controls also showed higher levels of methylation in the control group, with significant differences for the *BRCA1* genes ($p=0.001$; farmers x controls, $p=0.001$) *BRCA2* ($p=0.004$; MDS x controls, $p=0.004$; farmers x controls, $p=0.014$) and *LIG4* ($p=0.001$, in MDS x controls and farmers x controls). The correlation analysis between methylation and expression showed a positive and strong correlation for *LIG4* gene in the Advanced Forms MDS group ($p=0.006$; $\rho=0.798$) and a positive and weak correlation for *BRCA1* gene in the exposed farmers group ($p= 0.046$; $\rho=0.340$). This study corroborates the phenomenon of hypermethylation in some DNA repair genes in Myelodysplastic Syndrome and suggests a significant reduction in methylation in farmers exposed to pesticides.

Keywords: Myelodysplastic Syndrome. Farmers. Exposure to pesticides. DNA methylation.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Aspectos gerais da Síndrome Mielodisplásica: definição e epidemiologia.....	12
1.2 Classificação diagnóstica e prognóstica.....	13
1.3 Patogênese da SMD.....	16
1.4 Agrotóxicos e câncer	19
1.5 Importância epigenética da metilação na SMD e mediante exposição a agrotóxicos.....	21
1.6 Danos ao DNA e Genes de reparo de fita dupla.....	24
1.6.1 Gene <i>ATM</i> (<i>Ataxia telangiectasia mutated</i>).....	26
1.6.2 Genes <i>BRCA1</i> e <i>BRCA2</i> (<i>Breast Cancer 1 e 2</i>).....	28
1.6.3 Gene <i>RAD51</i> (<i>Radiation-Sensitive Yeast Mutations</i>).....	30
1.6.4 Gene <i>LIG4</i> (<i>DNA Ligase IV</i>).....	32
2 OBJETIVOS	34
2.1 Objetivo geral.....	34
2.2 Objetivos específicos.....	34
3 MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1 Aspectos éticos.....	35
3.2 Casuística.....	35
3.2.1 Pacientes com SMD.....	35
3.2.2 Agricultores.....	36
3.2.3 Controles.....	36
3.3 Extração de DNA.....	37
3.4 Cariótipo por Banda G.....	38
3.5 Análise de Metilação por Pirosequenciamento.....	40
3.5.1 Escolha das regiões para análise.....	40
3.5.2 Modificação com bissulfito de sódio.....	42
3.5.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR Convencional) e Eletroforese.....	44
3.5.4 Princípio do pirosequenciamento e análise de metilação de sítios CpG.....	47
3.6 Análise estatística.....	51
4 RESULTADOS	52
4.1 Pacientes com Síndrome Mielodisplásica.....	52
4.1.1 Caracterização dos pacientes	
4.1.2 Análise de metilação dos genes de reparo de fita dupla em pacientes com SMD.....	57
4.1.2.1 Variáveis.....	57
4.1.2.2 Padrão Gráfico de Metilação.....	61
4.2 Agricultores.....	62
4.2.1 Caracterização dos indivíduos.....	62
4.2.2 Análise de metilação dos genes de reparo de fita dupla em agricultores.....	64
4.2.2.1 Variáveis.....	64
4.2.2.2 Padrão Gráfico de Metilação.....	68

4.3 Análise comparativa de metilação entre controles, grupos de pacientes e de agricultores.....	69
4.4 Análises de correlação.....	73
5 DISCUSSÃO.....	76
6 CONCLUSÃO.....	91
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92
APÊNDICES.....	104

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais da Síndrome Mielodisplásica: definição e epidemiologia

As síndromes mielodisplásicas (SMD) constituem um grupo heterogêneo de doenças clonais hematopoiéticas caracterizadas por hematopoiese ineficaz e citopenias periféricas, com espectro clínico abrangente e risco variável – de 30 a 40% dos pacientes - de evolução para leucemia mieloide aguda (LMA) (HELLSTRÖM-LINDBERG e MALCOVATI, 2008).

A hematopoiese ineficaz é decorrente de um defeito de diferenciação celular na medula óssea associada à apoptose elevada. A apoptose das células dentro da medula óssea ocorre antes que elas possam se diferenciar em células maduras, levando a citopenias no sangue periférico nas linhagens eritróide, granulocítica e megacariocítica. Esta apoptose pode ser direcionada por uma via intrínseca, envolvendo mitocôndria e proteínas da família Bcl-2, ou extrínseca, envolvendo receptores de morte celular na superfície da célula (ECONOMOPOLOU *et al.*, 2008; MORAES *et al.*, 2009).

As SMDs afetam, principalmente, adultos idosos. A incidência mundial é de 5,3 a 13,1/100 mil habitantes (COGLE, 2015), chegando a 20/100 mil habitantes na faixa etária superior a 70 anos. A epidemiologia na América do Sul, segundo estudos de Belli *et al.* (2015), indica idade média ao diagnóstico de 69 anos. E no Brasil, em levantamento realizado por Magalhães *et al.* (2010), a idade média dos pacientes é 68,3 anos, sendo que cerca de 51% destes são mulheres.

As SMDs primária (*de novo*), ou seja, quando as causas não são identificadas, não têm a etiologia completamente esclarecida e estão relacionadas, além de a alterações citogenéticas, a mutações em genes participantes de vias de sinalização celular, como as relacionadas à diferenciação e proliferação celular, por exemplo (SOUZA *et al.*, 2014). Também podem ser decorrentes de infecções virais e defeitos em mecanismos de reparo de DNA, tendo como manifestações clínicas mais comuns anemia, fadiga, palidez, dispnéia, púrpura, complicações hemorrágicas e, ocasionalmente, infecções devido à leucopenia (BORTOLHEIRO, 2006; DOLATSHAD *et al.*, 2015; MAGALHÃES, 2006).

A maioria dos casos de SMD é primária, enquanto casos secundários, geralmente advindos de exposição a agentes tóxicos, são geralmente mais agressivos (VASSALO e MAGALHÃES, 2009). A SMD secundária manifesta-se cerca de quatro a sete anos após a exposição inicial ao agente tóxico, que podem ser, inclusive, provenientes de quimio ou radioterapia, correspondendo a cerca de 10% dos casos (PINHEIRO e CHAUFFAILLE, 2006).

1.2 Classificação diagnóstica e prognóstica

O principal sistema para diagnóstico e classificação dos aspectos clínicos, laboratoriais e características morfológicas foi elaborado pela OMS, passou pela atualização mais recente em 2016, e conta com 8 categorias (Tabela 1): SMD com displasia em única linhagem (SMD-DUL); SMD com sideroblastos em anel (SMD-SA); SMD com excesso de blastos 1 e 2 (SMD-EB-1 e SMD-EB-2); SMD com displasia em multilinhagem (SMD-DML); del(5q), SMD inclassificável e citopenia refratária da infância, este último de forma provisional (WHO, 2017).

Além da classificação diagnóstica, tem-se também a prognóstica, o *International Prognostic Scoring System - Revised* (IPSS-R), que é a estratificação de risco padrão para SMD. Nele, há a atribuição de pontuações baseadas nos achados citogenéticos e de plaquetas, neutrófilos, blastos, hemoglobina e idade, definindo assim as categorias de risco (muito baixo – baixo – intermediário – alto – muito alto) e suas respectivas estimativas de sobrevida (Tabelas 2, 3 e 4). Tal estratificação é de grande importância para a tomada de decisões clínicas e direcionamento terapêutico (GREENBERG *et al.*, 2012; HONG e HE, 2017).

No entanto, todas estas classificações nem sempre são suficientes para definir, com certeza, o diagnóstico da enfermidade, quando os achados clínicos e laboratoriais não são coerentes com os morfológicos, ou a displasia secundária é causada por deficiências nutricionais ou inflamações, ou ainda quando hipocelularidade da medula óssea ou mielofibroses atrapalham uma visualização clara do processo da doença, por exemplo (VARDIMAN *et al.*, 2009).

Tabela 1 - Critérios de classificação para os subtipos de Síndrome Mielodisplásica (Adaptado OMS 2016)

Subtipo	Número de linhagens displásicas	Número de citopenias ¹	Sideroblastos em anel em elementos eritróides da medula óssea	Blastos no sangue periférico (SP) e medula óssea (MO)	Citogenética
SMD-DU	1	1 a 2	SA<15% (ou <5% ²)	SP <1%, MO <5%, sem bastões de Auer	Qualquer uma (exceto se cumprir critérios para del(5q) isolado)
SMD-DM	2 a 3	1 a 3	SA<15% (ou <5% ²)	SP <1%, MO <5%, sem bastões de Auer	
SMD-SA	1	1 a 2	SA≥15% (ou ≥5% ²)	SP <1%, MO <5%, sem bastões de Auer	
<i>SMD-SA-DU</i>				SP <1%, MO <5%, sem bastões de Auer	
<i>SMD-SA-DM</i>	2 a 3	1 a 3	SA≥15% (ou ≥5% ²)	SP <1%, MO <5%, sem bastões de Auer	del(5q) isoladamente ou com mais uma anormalidade, exceto perda do cromossomo 7 ou del (7q)
SMD com del(5q) isolada	1 a 3	1 a 2	Nenhum ou algum	SP <1%, MO <5%, sem bastões de Auer	
SMD-EB	1 a 3	1 a 3	Nenhum ou algum	SP 2~4% ou MO 5~9%, sem bastões de Auer	Qualquer uma
<i>SMD-EB-1</i>				SP 5~19% ou MO 10~19%, ou bastões de Auer	
<i>SMD-EB-2</i>	1 a 3	1 a 3	Nenhum ou algum		
SMD-I	1 a 3	1 a 3	Nenhum ou algum	SP = 1% ⁴ , MO < 5%, sem bastões de Auer	Qualquer uma
<i>1% de blastos</i>					
<i>DUL e pancitopenia</i>				3	
<i>Baseado em anormalidade citogenética</i>	0	1 a 3	<15% ³	SP <1%, MO < 5%, sem bastões de Auer	Anormalidades indicativas de SMD

Legenda: SMD-DU: SMD com displasia em única linhagem; SMD-DM: SMD com displasia multilinhagem; SMD-SA: SMD com sideroblastos em anel; SMD-EB: SMD com excesso de blastos; SMD-I: SMD inclassificável.

Fonte: Adaptado de *Classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues* (OMS, 2017).

¹: Citopenias definidas como Hb <10 mg/dL, plaquetas <100 x 10⁹/L e neutrófilos < 1.8 x 10⁹/L; monócitos devem ser < 1.0 x 10⁹/L;

²: Se houver mutação em *SF3B1*;

³: Casos com SA > 15% e displasia eritróide significativa são classificados como SMD-SA-DUL

⁴: 1% de blastos deve ser observado em pelo menos duas ocasiões diferentes.

Tabela 2 - IPSS-R Grupos citogenéticos de risco*

Prognóstico	Anormalidades citogenéticas
Muito favorável	-Y, del(11q)
Favorável	Normal; del(5q), del(12p), del(20q); dupla, incluindo del(5q)
Intermediário	del(7q), +8, +19, i(17q), qualquer outro único ou duplo clones independentes
Desfavorável	-7, inv(3)/t(3q)/del(3q); dupla, incluindo -7/del(7q), cariótipo complexo (3 alterações)
Muito desfavorável	Complexo > 3 alterações

Tabela 3- Valores de scores do IPSS-R*

Variável prognóstica	0	0,5	1	1,5	2	3	4
Citogenética	Muito Favorável		Favorável		Intermediário	Desfavorável	Muito desfavorável
% de blastos na M.O.	≤2		2 a 5%		5 a 10%	>10%	
Hemoglobina (mg/dL)	≥ 10		8 a 10	<8			
Plaquetas (x10 ⁹ /L)	≥ 100	50 a 100	< 50				
Leucócitos (x10 ⁹ /L)	≥ 0,8	<0.8					

Tabela 4- Classificação de risco do IPSS-R a partir dos scores*

Categoria de Risco	Score
Muito baixo	≤ 1,5
Baixo	> 1,5 a 3
Intermediário	>3 - 4.5
Alto	>4.5 - 6
Muito alto	>6

*Fonte: Adaptado de Greenberg *et al.* (2012)

Revisões frequentes nas classificações são de grande importância para incorporar aos critérios diagnósticos refinamentos nas interpretações morfológicas e os avanços genéticos, que cada vez mais rapidamente levam à definição de marcadores diagnósticos e prognósticos e que, em conjunto, constroem um melhor entendimento da patofisiologia dessas doenças (ARBER, 2016).

1.3 Patogênese da SMD

O desenvolvimento das síndromes mielodisplásicas é considerado um processo de múltiplas variáveis (idade, sexo masculino, tabagismo, etilismo, exposição ambiental e/ou ocupacional, quimio e radioterapias) e etapas, caracterizado inicialmente por excessiva apoptose, o que resulta em citopenias no sangue periférico e em proliferação aumentada de elementos hematopoiéticos na medula, numa tentativa compensatória, tornando este ambiente hiper celular (mas também pode ser normocelular e, em alguns casos, hipocelular). Em seguida, há o aumento de sinais anti-apópticos, o clone neoplásico pode então proliferar, e a instabilidade genômica causada por metilação alterada de genes de reparo e de outros supressores tumorais e também por encurtamento de telômeros leva a anormalidades cromossômicas e à progressão da doença (CATENACCI & SCHILLER, 2005).

As síndromes mielodisplásicas apresentam alterações citogenéticas em 50-60% dos casos, porcentagem que pode ser ainda maior, considerando que a identificação de cariótipo normal na outra parte dos pacientes pode ser devida à falha técnica na obtenção de metáfases analisáveis, por exemplo (TORMO *et al.*, 2010).

Dados citogenéticos são importantes parâmetros para diagnóstico, estratificação de risco e prognóstico em várias patologias, com anormalidades específicas influenciando diretamente na terapia escolhida e modulação da intensidade do tratamento (HASTINGS *et al.*, 2016).

Em SMD, as alterações citogenéticas podem ser monossomias, trissomias, deleções de braços de cromossomos, translocações balanceadas ou cariótipos complexos (três ou mais anomalias em uma única metáfase). Monossomias ou deleções dos braços longos dos cromossomos 5, 7 e 20 são as anormalidades mais comuns em 10 a 15% dos casos; deleções 5 ou 5q são responsáveis por manifestações clínicas heterogêneas, com alguns pacientes tendo bom prognóstico enquanto outros têm risco aumentado de evolução para LMA e baixa sobrevivência, sendo esse curso clínico agressivo observado também em pacientes com deleção 7

ou 7q; enquanto deleções 20q estão associados com instabilidade genômica. Deleções 5 ou 5q e 7 ou 7q são as mais frequentes em pacientes com SMD secundária (GUPTA *et al.*, 2010; JHANWAR, 2015). Alterações nos cromossomos 8, 11, 13, 17, 21, X e nulissomia do Y também são frequentes em SMD. Ainda que 50% dos pacientes possam apresentar cariótipo normal ao diagnóstico, as anormalidades podem ser detectadas durante a evolução da doença; nestes pacientes, uma série de alterações moleculares são responsáveis por um quadro clínico com prognóstico bastante variável (CHAUFFAILLE, 2006a).

A perda de material genético pelas alterações cromossômicas pode ser responsável pela perda de genes supressores tumorais, de crescimento hematopoiético e receptores; já nos pacientes com cariótipo normal, mutações em oncogenes afetam importantes vias de sinalização responsáveis, em parte, pela patogênese da SMD (JACOBS, 1989; CHAUFFAILLE, 2006b). Isto inclui, por exemplo, mutações como as dos proto-oncogenes *Ras*, que quando presentes em pacientes com SMD podem ser preditores de evolução precoce para LMA (NEUBAUER *et al.*, 1991; PADUA & WEST, 2000). Mutações em *JAK2* também podem estar presentes durante a progressão da doença e serem direcionadoras de uma transformação para LMA (MACHADO-NETO *et al.*, 2011).

Jhanwar (2015) também relaciona com a patogênese de SMD alterações genéticas e epigenéticas comumente relacionadas a *splicing* de RNA, modificação da cromatina, regulação de transcrição, metilação de DNA, e controle de reparo do DNA. Estes fatores, combinados, são responsáveis pela variedade de fenótipos apresentados em SMD e, embora alguns casos possam progredir para LMA, ambas as doenças possuem patogênese distinta, com uma grande variedade de mecanismos moleculares envolvidos, mas que ainda são pouco entendidos (YOSHIDA *et al.*, 2011; KANG *et al.*, 2015). Frequentemente, a SMD é apontada como sendo um estágio “pré-leucêmico”, mas estudos apontam que, apesar das similaridades de respostas terapêuticas e desfechos, biologicamente são doenças diferentes, com maior perda de potencial mitocondrial, maior expressão de anexina V e maior atividade de caspase-3 em SMD que em LMA, todos esses fatores relacionados a maior apoptose (ALBITAR *et al.*, 2002).

Dentre os fatores externos envolvidos no desenvolvimento de SMD, tem-se como importantes fatores de predisposição a exposição a agrotóxicos e a solventes orgânicos, como o benzeno, devido a uma progressiva deterioração da hematopoiese e indução de anormalidades cromossômicas (NATELSON, 2007; NISHIKAWA *et al.*, 2012). A exposição ocupacional, ambiental ou recreativa (está presente no cigarro) ao benzeno por mais de 5 anos, mesmo em baixas doses, está relacionada ao aumento dos riscos de desenvolvimento de SMD e LMA (POYNTER *et al.*, 2016).

Em relação à exposição a pesticidas, os mecanismos exatos que levam ao surgimento de SMD ainda são incertos, mas, como possíveis causas, além do aumento de alterações cromossômicas, tem-se ainda o aumento das ERO (espécies reativas de oxigênio), que levam a danos no DNA, em proteínas e na produção hematopoiética; e a expressão aberrante ou substituição de determinados receptores e ligantes (ligantes endógenos de receptores nucleares esteróides, incluindo estrógenos e andrógenos), resultando em modificações nas expressões de genes, ao alterar suas cascatas de sinalização (JIN *et al.*, 2014).

A exposição a determinados fármacos e à radiação ionizante (químico ou radioterapias para neoplasias ou outras doenças) pode levar ao desenvolvimento de SMD secundária à terapia (SMD-*t*), representando 10-20% dos casos, resultado da citotoxicidade dos tratamentos e da seleção de clones com alta taxa de eventos mutacionais; com um maior acúmulo de anormalidades citogenéticas, tem-se um quadro clínico bastante heterogêneo, em pacientes geralmente mais jovens dos que os com SMD *de novo*, com pior prognóstico e rápida progressão para LMA (BURKE, *et al.*, 2017).

Diante da heterogeneidade de fatores e manifestações clínicas de SMD, são necessários extensivos estudos a fim de entender melhor a fisiopatologia da doença. Assim, é possível melhorar o diagnóstico e classificação, além de identificar alvos terapêuticos e marcadores preditores de sobrevida e de resposta ao tratamento, sendo a investigação dos mecanismos moleculares e seus impactos nas manifestações clínicas uma importante ferramenta (PELLAGATTI e BOULTWOOD, 2015).

1.4 Agrotóxicos e câncer

No Brasil, a definição de agrotóxicos está definida na Lei Nº 7802 (BRASIL,1989), descrevendo-os como agentes físicos, químicos ou biológicos, de uso agrícola ou urbano, destinados a alterar a composição da fauna ou flora a fim de evitar a ação danosa de seres vivos considerados nocivos.

Os agrotóxicos abrangem uma grande variedade de usos (inseticidas, fungicidas, herbicidas, acaricidas) e de substâncias químicas envolvidas, que podem ter características imunotóxicas, mutagênicas ou carcinogênicas (dependendo ou não da dose e do tempo de exposição), o que explica sua associação com o desenvolvimento de câncer (BAILEY *et al.*, 2015).

A agricultura é uma das principais atividades econômicas brasileiras e, com o intenso uso de pesticidas vem a preocupação com os impactos na saúde. Diazinona, malation e glifosato são permitidos tanto para uso no campo quanto domissanitário, e estes agentes apresentam efeitos semelhantes de carcinogenicidade demonstrados em estudos *in vitro* e *in vivo* (genotoxicidade, imunossupressão, estresse oxidativo, alterações celulares, desregulação hormonal e inflamação crônica), o que aumentam as chances de ação sinérgica, relacionadas ao desenvolvimento de Linfoma Não-Hodgkin (LNH) (COSTA *et al.*, 2017).

Dentre os agricultores, a exposição pode se dar através da pele, da boca ou da respiração, durante a manipulação, preparo ou aplicação dos pesticidas; ou ainda a partir da pulverização destes produtos sobre as plantações, o que causa uma extensa dispersão, contaminando o ar e a água, afetando inclusive a população que vive em áreas próximas às plantações, e acaba sofrendo com os efeitos crônicos dessa exposição, tais como: anormalidades na produção de hormônios, infertilidade, defeitos congênitos e câncer (INCA, 2019).

Para a população rural e trabalhadores agrícolas, alguns pontos que são de especial relevância são o uso correto de equipamentos de proteção individual (EPIs), o correto armazenamento e manejo desses compostos nos locais de trabalho, assim como o descarte adequado dos recipientes e cuidados durante a lavagem das roupas de trabalho (RIBEIRO *et al.*, 2012).

Na classificação de carcinogenicidade, feita pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC), um dos agrotóxicos mais utilizados mundialmente, o herbicida Glifosato, consta nesta lista na categoria 2A (provável carcinógeno para humanos); no Brasil, a ANVISA não reconhece esse risco potencial, alegando que não há evidências suficientes de carcinogenicidade, embora reconheça que há uma preocupação internacional com a ocorrência de linfomas (IARC, 2020; ANVISA, 2018).

O desenvolvimento de neoplasias relacionado à exposição a pesticidas sintéticos é um assunto que já acumula inúmeras evidências e acontece, dentre vários fatores, devido ao estresse oxidativo, distúrbios metabólicos e danos ao DNA, representando um problema de saúde pública e uma ameaça, principalmente, às populações mais vulneráveis, como os agricultores, que são direta e diariamente afetados (CURL *et al.*, 2020).

Um dos efeitos mais deletérios dos pesticidas no metabolismo celular e atividades fisiológicas se dá através da geração de ERO's, capazes de promover oxidação de lipídios e proteínas e inativar enzimas, por exemplo (LUSCHAK *et al.*, 2018). Segundo Landau-Ossondo *et al.* (2009), a produção de radicais livres gerada pelos pesticidas pode causar iniciação e progressão tumoral através da inibição da comunicação celular através das junções GAP, pois o bloqueio dessa comunicação entre células saudáveis e pré-neoplásicas faz com que estas escapem do controle de crescimento exercido pelas células normais circundantes, criando assim um microambiente tumoral, o que pode acontecer quando há exposição a diclorodifeniltricloroetano (DDT) e Paraquat, por exemplo.

Em um estudo prévio do nosso grupo, Costa *et al.* (2021) descrevem anormalidades cromossômicas como aneuploidia, del(11), del(18) e add(4),

encontradas em trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos (entre eles paraquat e glifosato); além de uma desregulação na expressão gênica de genes de reparo de fita simples e dupla, entre eles *ATM*, e *LIG4*, que estavam menos expressos em trabalhadores com mais de 12 anos exercendo essa função, e *BRCA2*, menos expresso nos agricultores que apresentaram anormalidades cromossômicas, refletindo, possivelmente, o efeito genotóxico dessa exposição.

1.5 Importância epigenética da metilação na SMD e mediante exposição a agrotóxicos

Epigenética é o estudo de mudanças na expressão gênica, que ocorrem sem que haja mudanças na sequência do DNA, pode ser desencadeada por fatores ambientais, e se dá por diversos mecanismos, como modificação de histonas, expressão de miRNAs e metilação do DNA (COLLOTTA *et al.*, 2013).

A metilação é um processo fisiológico normal, que ocorre através da adição de um grupamento metil ao carbono 5 de uma citosina seguida de uma guanina (chamados sítios CG's; regiões do genoma com acúmulo desses sítios são chamadas de ilhas CpG), um processo mediado por enzimas chamadas de DNA metiltransferases (DNMT1, DNMT3A e DNMT3B) (BOND *et al.*, 2020).

Na hematopoiese, a diferenciação e proliferação das células tronco, assim como a regulação da granulopoese, dependem diretamente do mecanismo de metilação que, quando desregulado, é um fator que conduz ao desenvolvimento de malignidades hematológicas, como LMA e SMD (BENETATOS & VARTHOLOMATOS, 2018).

Para as síndromes mielodisplásicas, ainda não é muito clara a relação entre exposição a pesticidas e risco de desenvolver a doença, mas vários estudos apontam essa tendência, como mostra a metanálise de Jin *et al.* (2014), que relaciona a exposição a inseticidas com maiores chances de desenvolver SMD, principalmente os subtipos anemia refratária e anemia refratária com sideroblastos em anel.

Um fator interessante que tem sido relatado é o encurtamento progressivo dos telômeros dos leucócitos em populações que estão sob exposição continuada a pesticidas, um fenômeno que também é especialmente observado em trabalhadores agrícolas que desenvolveram SMD, indicando uma possível correlação (ANDREOTTI *et al.*, 2015). Pacientes com SMD podem apresentar telômeros mais curtos do que pessoas da mesma faixa etária sem a doença, sendo este um fator já considerado como importante direcionador da evolução da doença e marcador prognóstico (HWANG *et al.*, 2016; WILLIANS *et al.*, 2017).

Telômeros são estruturas localizadas no final dos cromossomos, compostas por DNA e proteínas associadas, que têm a função de proteger e garantir uma correta replicação dos cromossomos durante a divisão celular. Junto com a metilação do DNA são os principais marcadores de tempo de vida celular e estabilidade genômica (PEDROSO, *et al.*, 2020).

Alterações dos padrões de metilação global do DNA ou de genes específicos (hipometilação ou hipermetilação) têm sido investigadas e constatadas em vários tipos de cânceres, assim como a relação entre exposição a pesticidas e desregulação epigenética, que pode ocorrer através de estresse oxidativo pela geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), como ilustrado na Fig.1 (SESTI *et al.*, 2012; SABARWAL *et al.*, 2018)). O excesso de radicais livres provoca um desbalanço fisiológico que resulta em danos severos a estruturas celulares e a importantes moléculas como o DNA, o que culmina em quebras e desregulação da expressão através de metilação ou miRNAs, por exemplo (TEODORO *et al.*, 2019). Alterações na metilação também podem ocorrer pelo desequilíbrio da atividade das metiltransferases, visto que as DNMTs, que regulam a metilação, são potenciais alvos de ligação para os pesticidas, que afetam a atividade destas enzimas (LIN *et al.*, 2010; CORONADO-POSADA & OLIVERO-VERBEL, 2019). Desaulniers *et al.* (2009), observaram redução da expressão de DNMT1 e DNMT3B mediante exposição a altos níveis de organoclorados, bifenilos policlorados e metimelcúrio, assim como redução da abundância de S-adenosilmetionina (um doador universal de metil) e, como consequência, observaram também menor metilação global de DNA e na região promotora do gene supressor tumoral p16^{INK4a}. Temos ainda a

interação com componentes dietários doadores de grupos metil, e visto que a contaminação dos alimentos e da água por pesticidas é um grande problema ambiental atual, estes doadores de metil estão diariamente presentes na nossa alimentação (COLLOTTA *et al.*, 2013), entre outros mecanismos.

Padrões aberrantes de metilação estão descritos para alguns genes em SMD, sendo um dos mecanismos epigenéticos mais estudados na patofisiologia da doença e na influência sobre prognósticos, tendo a hipermetilação como um dos fatores de evolução para LMA (SOLOMON *et al.*, 2008).

O silenciamento da expressão gênica por metilação em SMD é tratado através da terapia com drogas hipometilantes, como a azacitidina e a decitabina, que são inibidores de metiltransferases, utilizadas para pacientes de alto risco, a fim de reduzir a hipermetilação global e de genes como *TET2*, *DNMT3A*, *EZH2*, *CDKN2B* e *NOTCH1*, por exemplo (KHAN *et al.*, 2013; BOND *et al.*, 2020).

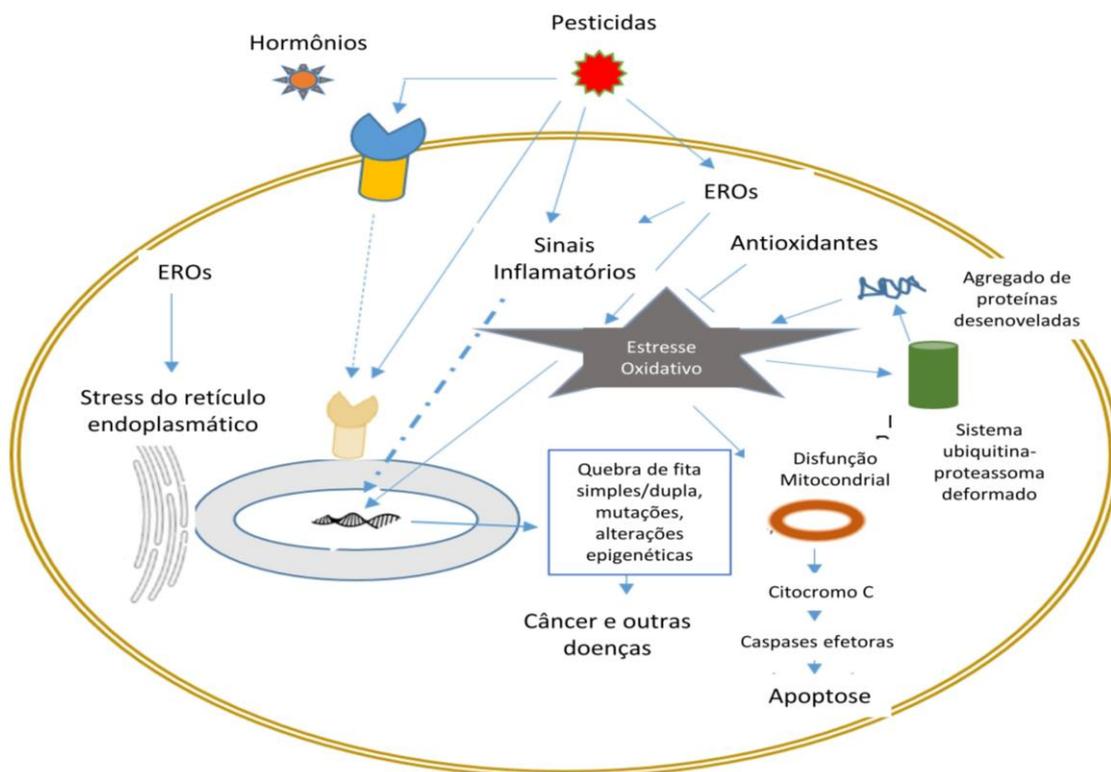
A resposta a esse tipo de abordagem quimioterápica geralmente é eficaz, resultando em controle da proliferação, maior tempo de remissão e de sobrevida, o que indica que os mecanismos de metilação em SMD parecem ser de fundamental importância, havendo assim a necessidade de melhor entendimento sobre suas consequências e principais genes e vias afetados (ISSA, 2010).

Estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisa demonstrou que uma desregulação epigenética através de metilação, em genes relacionados à resposta imune, ciclo celular e sistema de reparo, podem ter influência no desenvolvimento de anormalidades cromossômicas em pacientes com SMD, devido à diminuição da síntese de DNA polimerases com atividade translesão (CAVALCANTE *et al.*, 2020).

Um fator importante na nossa atualidade, que tem íntima relação com o fenômeno de carcinogênese, é a exposição a pesticidas, que comprovadamente provoca danos ao DNA através de quebras de fita simples ou dupla, influencia a ocorrência de aberrações cromossômicas e provoca alterações nos mecanismos epigenéticos de controle da expressão gênica como os RNA não-codificantes, as modificações de histonas e a metilação do DNA (SABARWAL *et al.*, 2018). Na figura 1 é mostrado um esquema de como a exposição a pesticidas pode levar a

modificações epigenéticas. Pesticidas, como por exemplo os piretróides, possuem a capacidade de se ligar diretamente ao DNA, provocando dessa forma alterações epigenéticas ao interferir na expressão gênica, assim como induzem estresse oxidativo e disfunção endócrina, dentre outras possibilidades de provocar o início de um processo carcinogênico (NAVARRETE-MENESES & PÉREZ-VERA, 2019).

Figura 1 - Pesticidas e sua relação com modificações epigenéticas.



Fonte: Adaptada de Sabarwal *et al.*, 2018

1.6 Danos ao DNA e Genes de reparo de fita dupla

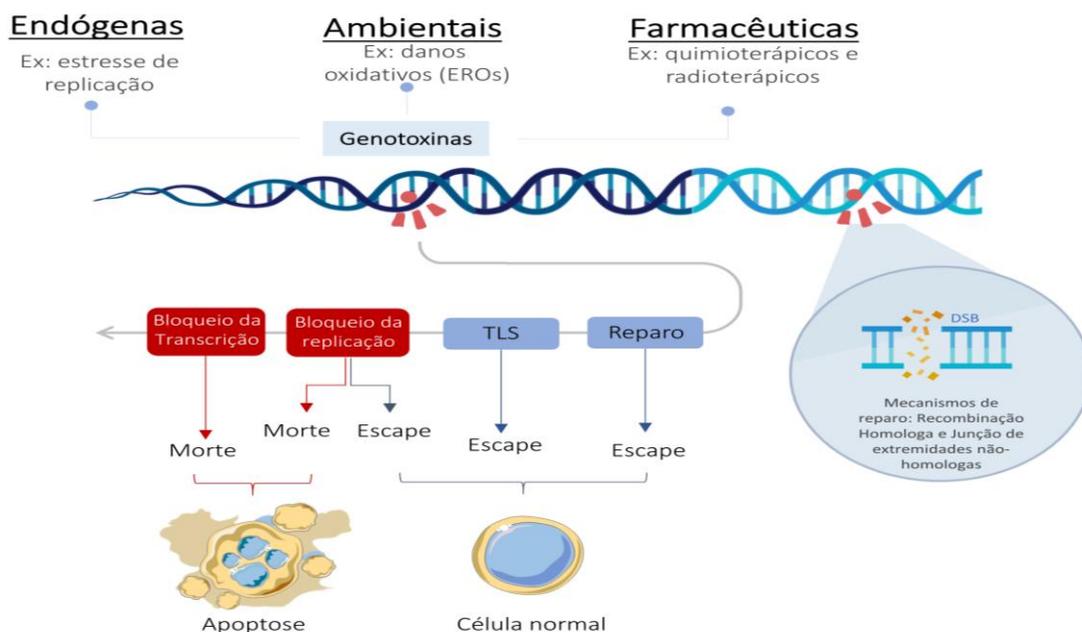
A ocorrência de danos no DNA, por agentes endógenos ou exógenos, quando não reparados levam à instabilidade genômica, pois provocam modificações na estrutura química da molécula e isso leva a uma quebra da fidelidade da informação genética; tal instabilidade faz parte do processo de carcinogênese, e para evitá-la é necessário que os mecanismos de reparo de lesões no DNA funcionem

adequadamente (GAHLON *et al*, 2017).

Lesões no material genético acontecem diariamente, e elas podem ter causa endógena, como erros na segregação cromossômica durante a citocinese e pela ação de radicais livres produzidos em processos celulares e metabólicos; ou exógena, como consequências de exposições ambientais como radiação UV e ionizante ou substâncias químicas pertencentes a uma vasta gama de produtos (Janssen *et al.*, 2011; Roos *et al.*, 2015).

O ataque ao DNA provocado por essas moléculas, chamadas de genotoxinas, provoca lesões que necessitam de reparo rápido e livre de erros, a fim de evitar a geração de mutações nos genes e danos cromossômicos, pois caso o reparo não seja feito de forma adequada ou a apoptose não seja ativada para eliminar a célula com material genético defeituoso, isto provocará instabilidade genômica, que é um fator primordial no processo de carcinogênese (Roos *et al.*, 2015). A Figura 2 ilustra esse processo, no qual a célula pode ser reparada e escapar da apoptose, ou morrer devido à lesão.

Figura 2 - Fontes de danos ao DNA e possíveis desfechos, a partir da ocorrência ou não do reparo.



Legenda: TLS: Síntese translesão; DSB: quebra de fita dupla (*Double Strand Break*).

Fonte: Adaptada de Roos *et al.*, 2015.

As quebras de fita dupla (DSB) estão entre os danos mais deletérios que o DNA está passível a sofrer e, quando não são corretamente reparadas, podem levar a mutações e rearranjos cromossômicos (deleções e translocações) e apoptose que, como dito anteriormente, são eventos importantes na patogênese de SMD. Os dois principais e mais estudados mecanismos de reparo são: junção de extremidades não-homólogas (“NHEJ”; fases G0, G1 e início da S) e recombinação homóloga (“HR”; fases S e G2 do ciclo celular). Dos genes abordados em nosso estudo, *LIG4* (*DNA Ligase IV*) participa da via NHEJ; e *ATM* (*Ataxia telangiectasia mutated*), *BRCA1* (*Breast Cancer 1*), *BRCA2* (*Breast Cancer 2*) e *RAD51* (*Radiation-Sensitive Yeast Mutations*) fazem parte da via HR (DONOVAN e LIVINGSTON, 2010).

Os mecanismos de junção de extremidades não-homólogas e recombinação homóloga atuam de forma complementar, com uma diferença essencial entre eles, a necessidade de um molde intacto de DNA para reparo dos erros, que não é requerido pela NHEJ, o que torna este mecanismo mais passível de erros e, portanto, altamente mutagênico (JACHIMOWICZ *et al.*, 2019)

A recombinação homóloga é um processo metabólico de reparo que oferece alta fidelidade e tolerância a danos complexos no DNA, além de um importante suporte para a replicação e manutenção dos telômeros.

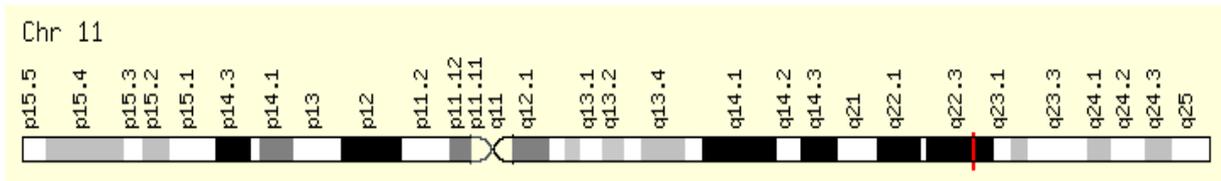
Os genes *BRCA1* e *BRCA2* participam da HR, sendo a proteína *BRCA2* uma importante mediadora no processo de reparo por essa via, e mutações nesse gene implicam em predisposição a câncer de mama, ovário e anemia de Fanconi (DONOVAN e LIVINGSTON, 2010).

1.6.1 Gene *ATM* (*Ataxia telangiectasia mutated*)

O gene *ataxia-telangiectasia mutated* (*ATM*), localizado no braço longo do cromossomo 11, na posição 22.3 (11q22.3; Fig.3), faz parte da família de genes *phosphatidylinositol-3 kinase* (PT3K) e consiste de 66 éxons que codificam uma fosfoproteína nuclear de 370 kDa (GUMY-PAUSE *et al.*, 2004). Desempenha importante papel na resposta a danos de fita dupla no DNA, sinalizando a necessidade de reparo e inicialização do *checkpoint* do ciclo celular, desacelerando a passagem das células de uma fase para a outra, dando assim mais tempo para

que o reparo seja efetuado sem erros, e ativando enzimas responsáveis pelo conserto das quebras (GUARINI *et al.*, 2012; KIM *et al.*, 2013).

Figura 3 - Localização do gene ATM no cromossomo 11, posição 22.3



Fonte: Gene Cards (*The human gene database*).

Nas células normais, a proteína codificada pelo gene *ATM* existe na forma dimérica ou multimérica, que é inativa, e que em resposta a danos dissocia-se em monômeros ativos responsáveis pela identificação do dano, recrutamento de outras proteínas de reparo, sinalização dos checkpoints do ciclo celular, regulação transcricional e ativação da senescência e apoptose (BEGAM *et al.*, 2017).

A atividade do *ATM* pode seguir uma sinalização canônica, que consiste na dissociação dimérica da proteína ATM, seguida da ativação destes monômeros e do recrutamento deles para o local de quebra; e a sinalização também pode ser não-canônica, quando não há dano detectável ao DNA, e ocorre a partir de mudanças na cromatina, de stress decorrente da replicação, de atividade telomérica ou ainda como resposta a ERO's (CREMONA & BEHRENS, 2014).

A proteína ATM ativada é capaz de fosforilar vários outros substratos que são fatores essenciais envolvidos na checagem e parada do ciclo celular (por exemplo, RAD50), supressão tumoral (p53) e reparo (BRCA1), portanto, alterações gênicas ou epigenéticas capazes de afetar a função da proteína têm consequências importantes no processo de carcinogênese e curso clínico desfavorável (GUARINI *et al.*, 2012; XU *et al.*, 2012; GU *et al.*, 2014; YAN *et al.*, 2017).

Mutações e polimorfismos neste gene têm sido associados ao desenvolvimento de SMD, devido ao seu importante papel no controle de danos ao DNA provocados por EROs nas células tronco hematopoiéticas, comprometendo assim sua diferenciação apropriada (ZHOU *et al.*, 2013).

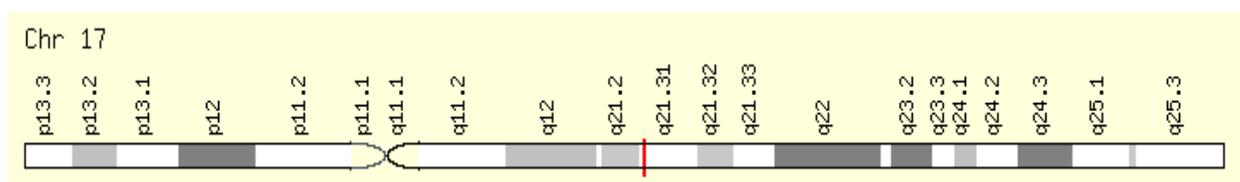
Em nosso laboratório, estudos genotípicos em genes de reparo mostraram associação entre o polimorfismo rs228593, no gene *ATM*, e melhor prognóstico em pacientes com SMD, entendendo-se com isso que o funcionamento adequado deste gene favorece melhor estabilidade genômica e, assim, tem-se uma doença com comportamento menos agressivo (RIBEIRO JR. *et al.*, 2013).

1.6.2 Genes *BRCA1* e *BRCA2* (*Breast Cancer 1 e 2*)

O gene *BRCA1* está localizado no braço longo do cromossomo 17, na posição 21.31 (17q21.31; Fig. 4), e seu produto primário é uma proteína composta por 1863 aminoácidos, que atua como supressora tumoral a partir da interação com outras moléculas, tendo esses complexos a função de corrigir erros de fita dupla do DNA, regular a divisão celular, promover ubiquitinação de proteínas e regulação transcricional. As alterações funcionais dessa proteína estão fortemente relacionadas a vários tipos de cânceres, com uma forte predileção por alguns (tumores hormônio-responsivos, por exemplo), sendo o de mama um dos mais extensivamente estudados (CERNE, *et al.*, 2012).

Juntamente com o gene *BRCA2*, desempenha um importante papel em manter a integridade celular, já tendo sido demonstrado que a perda de função de ambos pode levar à interrupção da proliferação celular, instabilidade cromossômica e maior sensibilidade a agentes genotóxicos, gerando assim um ambiente favorável à carcinogênese (VENKITARAMAN, 2014).

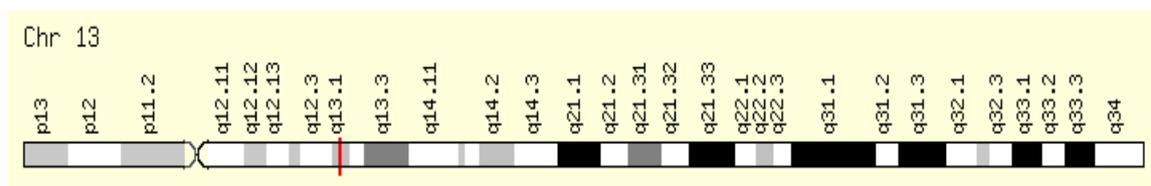
Figura 4 - Localização do gene *BRCA1* no cromossomo 17, posição 21.31



Fonte: Gene Cards (The human gene database).

Por sua vez, o gene *BRCA2* sintetiza uma proteína com 3418 aminoácidos, e está localizado no braço longo do cromossomo 13, posição 13.1 (13q13.1; Fig.5). Desempenha papel fundamental na manutenção da estabilidade genômica, atuando no reparo de danos e na regulação da citocinese, e mutações progressivas nesse gene são associadas a diversos tipos de tumores com pior desfecho da doença, como acontece com o câncer de próstata, por exemplo (JUNEJO & AIKHATEEB, 2020).

Figura 5 - Localização do Gene *BRCA2* no cromossomo 13, posição 13.1



Fonte: Gene Cards (The human gene database).

Apesar da participação na mesma via, os genes *BRCA1* e *BRCA2* atuam em diferentes etapas do reparo de fita dupla; a proteína *BRCA1* age tanto no reparo quanto na ativação de checagem do ciclo celular, sendo assim uma das primeiras a atuar diante de um dano: ela funciona tanto como sensor do dano (assim como ATM) quanto como mediadora do processo, recrutando outras proteínas e viabilizando a função delas através da formação de complexos (ROY *et al.*, 2012).

Uma dessas viabilizações envolve a ressecção na fita, no sítio onde houve o dano, para que haja a invasão por outras proteínas, entre elas a *BRCA2* que, dentro de um complexo (que envolve a proteína *RAD51*, também presente em nosso estudo), inicia o processo de reparo, aparentemente conduzindo a *RAD51* do seu local de produção para o local de ação, e controlando enzimaticamente a atividade desta proteína; além disso, protege a nova fita recém-sintetizada da ação de nucleases, tendo assim grande importância na manutenção da estabilidade genômica. Deficiências na produção ou função de *BRCA1* e/ou *BRCA2* resultam em acúmulos de quebras de cromátides e aberrações cromossômicas (ROY *et al.*, 2012; FOULKES & SHUEN, 2013).

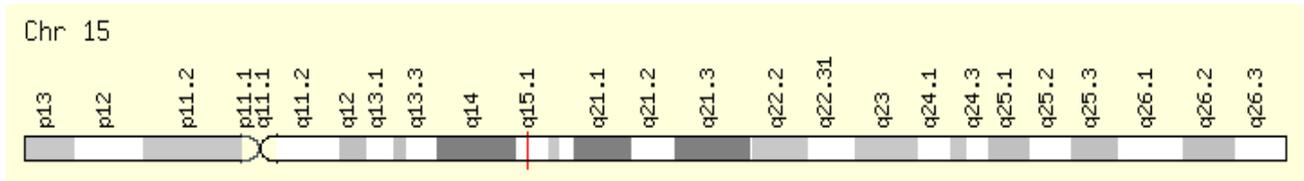
Os genes *BRCA1* e *BRCA2* formam um complexo de fundamental importância no mecanismo de reparo por recombinação homóloga, sendo sugerido que esse eixo atua segundo o conceito da letalidade sintética, que sugere a necessidade de alterações em dois ou mais genes para que a célula sofra apoptose; ou seja, se o conjunto *BRCA1/2* não funcionar apropriadamente para processar o reparo, mas a deficiência for apenas em um ou no outro gene, isto poderá levar ao escape do reparo e iniciação do processo de carcinogênese (RIBEIRO JR. *et al.*, 2019). Esse estudo do nosso laboratório demonstrou que *BRCA1/2*, que são alvos importantes no tratamento de tumores sólidos, também podem ser de essencial importância no direcionamento terapêutico de neoplasias mieloides, visto que quando há baixa expressão desses dois genes e também do *RAD51*, aumentam as chances de resposta a inibidores de PARP (poli ADP-ribose polimerase), esperando-se assim aumento da sobrevida.

1.6.3 Gene *RAD51* (*Radiation-Sensitive Yeast Mutations*)

RAD51 é um dos genes mais importantes do processo de recombinação homóloga, sendo sua função anormal um indicador de pior prognóstico em vários tipos de cânceres, visto que tais defeitos afetam diretamente várias vias intracelulares (como as desempenhadas pelos genes *p53*, *p21*, *Bcl-2*, *ATM*, *BRCA1/2*) (RADERSCHALL *et al.*, 2002; FUH *et al.*, 2020).

O gene está localizado no cromossomo 15, posição q15.1, e codifica uma proteína de 339 aminoácidos (Fig. 6). A proteína *RAD51* é uma ATPase DNA-dependente que se liga diretamente à *BRCA2*, esta promove a invasão da *RAD51* na fita a ser reparada, para que haja a formação de um filamento de nucleoproteína em DNA de fita simples, o qual posteriormente passa por um processo de emparelhamento homólogo, reparando a fita dupla (LAURINI *et al.*, 2020).

Figura 6 - Localização cromossômica do gene *RAD51* no cromossomo 15, posição q15.1



Fonte: Gene Cards (The human gene database).

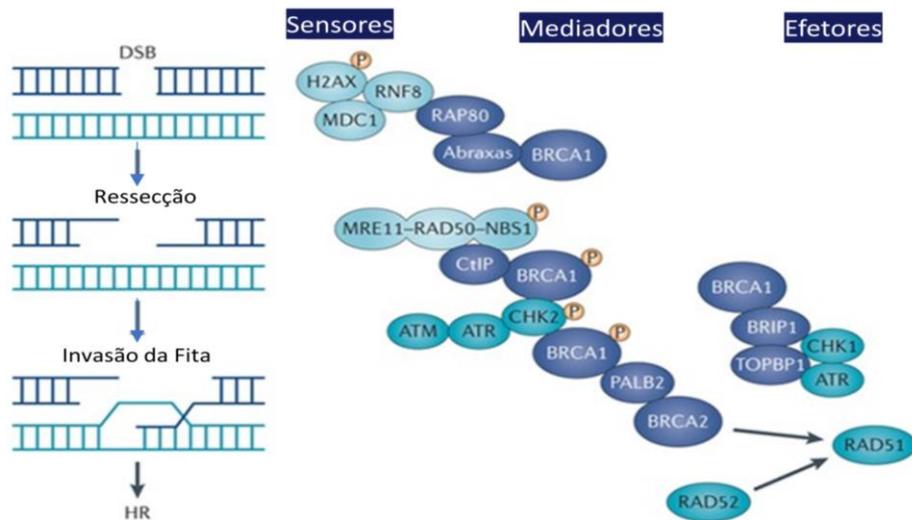
Devido ao seu papel central na recombinação homóloga, que é crucial no processo de carcinogênese, falhas na produção ou função da proteína RAD51 estão associadas não apenas ao desenvolvimento do câncer, mas também a um pior prognóstico, com ocorrência de perfil metastático e menor sobrevida (WIEGMANS *et al.*, 2014).

He e colaboradores, em 2014, demonstraram em sua metanálise relação entre um polimorfismo em *RAD51* e maiores chances de desenvolvimento de SMD. Um outro estudo, também com polimorfismos, realizado em nosso grupo de pesquisa, encontrou associação entre a ocorrência do genótipo polimórfico levando a uma maior expressão de *RAD51* e, conseqüentemente, SMD menos agressiva, devido, provavelmente, a uma maior taxa de reparo do DNA (RIBEIRO JR., 2015).

De forma concisa, o processo de reparo é iniciado com a detecção do dano ao DNA pela proteína ATM, que age como um sensor e cuja ativação recruta outras proteínas que atuam no reparo (Fig.7). ATM fosforila essas proteínas, ativando-as, entre elas BRCA1, que faz parte de um complexo chamado BRCA1–MRN (proteínas Mre11, Rad50 e Nbs1)–CtIP, o qual age provocando uma ressecção nas fitas onde houve o dano e novas bases deverão ser incorporadas.

BRCA1 fosforilada recruta, então, a proteína BRCA2, que possibilita a invasão do complexo efetor do reparo na fita, do qual faz parte RAD51 e outros genes, e que completarão o processo de incorporação de novos nucleotídeos através do mecanismo de recombinação-homóloga (ROY *et al.*, 2012).

Figura 7 – Genes envolvidos no mecanismo molecular de resposta ao dano de fita dupla de DNA



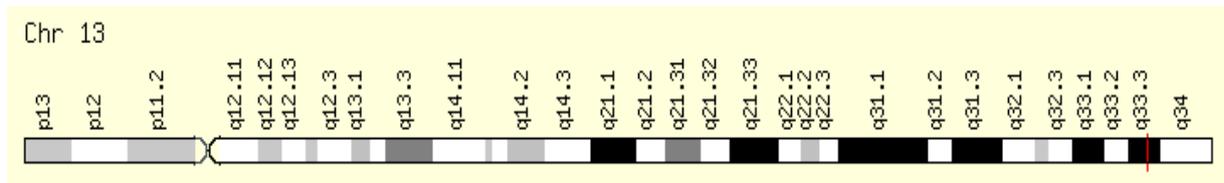
Fonte: Adaptada de Roy *et al.*, 2012.

1.6.4 Gene *LIG4* (DNA Ligase IV)

Assim como o *RAD51*, o gene *LIG4* e sua proteína exercem um papel chave no reparo de danos de fita dupla; alterações nas suas funções podem levar à desregulação dos processos de reparo e mecanismos de apoptose, com conseqüente maior susceptibilidade ao câncer e resposta ineficaz à terapia (ASSIS, 2013).

A proteína codificada por este gene, localizado no cromossomo (13q33-34, Fig.8) é uma DNA-ligase ATP-dependente e age na fase final do reparo, unindo a fita recém sintetizada de DNA à fita molde, e estabilizando a ligação entre as extremidades (PANNUNZIO *et al.*, 2018).

Figura 8 - Localização cromossômica do gene *LIG4* no cromossomo 13, posição q33-34



Fonte: Gene Cards (The human gene database).

Devido ao papel crucial que desempenha, sendo responsável pela fase final do reparo, perdas ou mudanças na função afetam diretamente a estabilidade genômica e estimulam o processo de tumorigênese, como câncer de mama e mieloma múltiplo (XIE *et al.*, 2014).

Estudo de nosso laboratório demonstrou uma menor expressão de *LIG4* em pacientes com SMD de pior prognóstico (SMD-EB 1 e 2, riscos alto e muito alto, anemia e neutropenia severas) e nos que progrediram para LMA, indicando que falhas na expressão ou função dessa proteína podem ser marcadores de pior desfecho (RIBEIRO JR. *et al.*, 2019).

Diante da reconhecida importância dos genes de reparo de fita dupla *ATM*, *BRCA1*, *BRCA2*, *LIG4* e *RAD51* e da epigenética, através do fenômeno de metilação, na patogênese e predição prognóstica de SMD, e sendo a relação entre exposição a agrotóxicos e alterações nos padrões de metilação um possível fator de desenvolvimento de neoplasias da medula óssea, hipotetiza-se neste trabalho a possibilidade de diferenças de metilação nestes genes entre indivíduos saudáveis, indivíduos expostos a agrotóxicos e pacientes com SMD.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o perfil de metilação dos genes atuantes no mecanismo de reparo de fita dupla no DNA (ATM, BRCA1, BRCA2, LIG4 e RAD51) e sua relação com a expressão gênica em amostras de pacientes portadores de Síndrome Mielodisplásica e de agricultores expostos a agrotóxicos.

2.2 Objetivos específicos

1. Avaliar o perfil de metilação da região promotora dos genes de reparo de fita dupla no DNA de pacientes com síndrome mielodisplásica;
2. Avaliar o perfil de metilação da região promotora dos genes de reparo de fita dupla no DNA de agricultores expostos a agrotóxicos;
3. Analisar as relações entre os níveis de metilação dos genes *ATM*, *BRCA1*, *BRCA2*, *RAD51* e *LIG4* e as variáveis clínico-laboratoriais dos pacientes com SMD e fatores prognósticos da doença;
4. Analisar as relações entre os níveis de metilação dos genes *ATM*, *BRCA1*, *BRCA2*, *RAD51* e *LIG4* e as variáveis de exposição dos agricultores;
5. Investigar se há correlação entre os níveis de metilação e de expressão gênica dos mesmos genes, em ambos os grupos de estudo.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Aspectos éticos

O presente estudo faz parte de projetos de pesquisa submetidos ao Comitê de Ética do Hospital Universitário Walter Cantídio, da Universidade Federal do Ceará, através do sistema da Plataforma Brasil, sob número de Parecer Consubstanciado do CEP: 4.505.895, tendo cumprido todas as exigências da resolução 196/96 do Conselho Nacional da Saúde.

A permissão para participação na pesquisa foi obtida de todos os pacientes e agricultores através de assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

3.2 Casuística

Esse estudo avaliou o perfil de metilação de 135 amostras de medula óssea (56 pacientes + 69 agricultores + 10 controles).

3.2.1 Pacientes com SMD

Foram incluídas nesse estudo 56 amostras de pool celular de medula óssea de pacientes portadores de SMD, classificados de acordo com os critérios diagnósticos da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2016), e seguidos no Ambulatório de Síndrome Mielodisplásica do Hospital Universitário Walter Cantídio, da Universidade de Federal do Ceará (HUWC/UFC), no período de 2007 a 2015. Os dados clínicos foram obtidos a partir de revisão de prontuários.

Foram excluídos deste estudo pacientes portadores de quaisquer outras doenças hematológicas que não fossem Síndrome Mielodisplásica, que não foram diagnosticados no Laboratório de Citogenômica do Câncer ou que a amostra não tivesse qualidade suficiente para a execução dos experimentos.

3.2.2 Agricultores

Foram incluídas amostras de medula óssea de 69 trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos oriundos da Região da Chapada do Apodi, em Limoeiro do Norte (a 200 km de Fortaleza/CE). Este território tem intensa atividade agrícola, principalmente fruticultura, e a intensa exposição a agrotóxicos nesta região tem sido relacionada a uma alta incidência de câncer, agravos crônicos e óbitos fetais na população desse município, quando comparado a outras cidades com reduzida exposição (RIGOTTO *et al.*, 2013).

Os indivíduos foram agrupados de acordo com seu histórico de exposição a agrotóxicos em: Grande produtor (trabalhadores da agroindústria), Agricultura Familiar (pequenos produtores rurais) ou Agricultura ecológica (indivíduos que relataram última exposição ocupacional a agrotóxicos há mais de dez anos). A divisão desses grupos e o questionário aplicado para obtenção de informações de modo de vida seguiu o modelo de Rigotto (2011), baseado nas categorias de produção agrícola desempenhadas no município.

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

3.2.3 Controles

Para análises do grupo controle, foram utilizadas amostras de medula óssea de dez indivíduos idosos. Essas amostras foram coletadas para exame diagnóstico, mediante quadro sugestivo de SMD. Descartada a doença, as amostras foram disponibilizadas para utilização como controles.

3.3 Extração de DNA

Foram coletadas amostras de medula óssea em tubos de vidro Vacutainer® contendo EDTA, 3ml de medula óssea destinados à realização da Citogenética Clássica e 5mL para os procedimentos de extração de DNA. Os experimentos de extração de DNA e expressão gênica foram realizados no laboratório de Citogenômica do Câncer.

Para a separação das células do pool celular da medula óssea realizou-se a transferência da amostra 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 0,01M). 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. Posteriormente foi acrescentado 750uL de Trizol LS Reagent® (Invitrogen, EUA) para cada 250uL de volume de PBS aplicado no pool medular. O material foi homogeneizado com pipeta até dissolução completa. Após este procedimento, o material foi armazenado no freezer a -80°C para posterior extração de DNA, que foi realizada a partir da utilização do Trizol Reagente®, de acordo com instruções do fabricante. Para cada 106 células armazenadas em 1mL de Trizol Reagente® foram adicionados 200µL de Clorofórmio para desproteíntização. Posteriormente, o material foi centrifugado a 11.000 rpm por 15 minutos a 2° C. O RNA presente na fase aquosa foi transferido para um microtubo estéril de 1,5mL para posterior procedimento de extração de RNA total. Após a completa remoção da fase aquosa (RNA), foi isolada a interfase (DNA) da fase orgânica (Proteínas e compostos fenólicos) e posteriormente precipitação do DNA com 300µL de etanol absoluto por mL de Trizol Reagente® e misturado por inversão por 3 minutos.

As amostras foram incubadas por 3 minutos a temperatura ambiente e em seguida provocada a sedimentação por centrifugação a 2000 rpm, por 5 minutos a 4°C. Após a remoção do sobrenadante (Proteínas), o pellet de DNA foi lavado com um 1mL de solução 0,1 M de Citrato de Sódio em Etanol 10%. O pellet de DNA com a solução de lavagem foi incubado por 30 minutos em temperatura ambiente, com inversão periódica, e posterior centrifugação em 2000 rpm, por 5 minutos a 4°C.

Após a lavagem, o pellet de DNA foi ressuspenso em 2mL de etanol 75%, armazenado por 15 minutos em temperatura ambiente e centrifugado por 2000 rpm, por 5 minutos a 4°C. O pellet de DNA, em tubo aberto, ficou exposto por 15 minutos para secar, em seguida foi ressuspenso em 350µL de NaOH 8mM pH~8,4 e, por fim, armazenado a -20°C para realização de posteriores experimentos.

Foram realizadas leituras espectrofotométricas nos comprimentos de ondas de 220, 260 e 280 nm para aferição de pureza, concentração e contaminação das amostras. Foram analisadas amostras com relação $A_{260}/A_{280} > 1,8$.

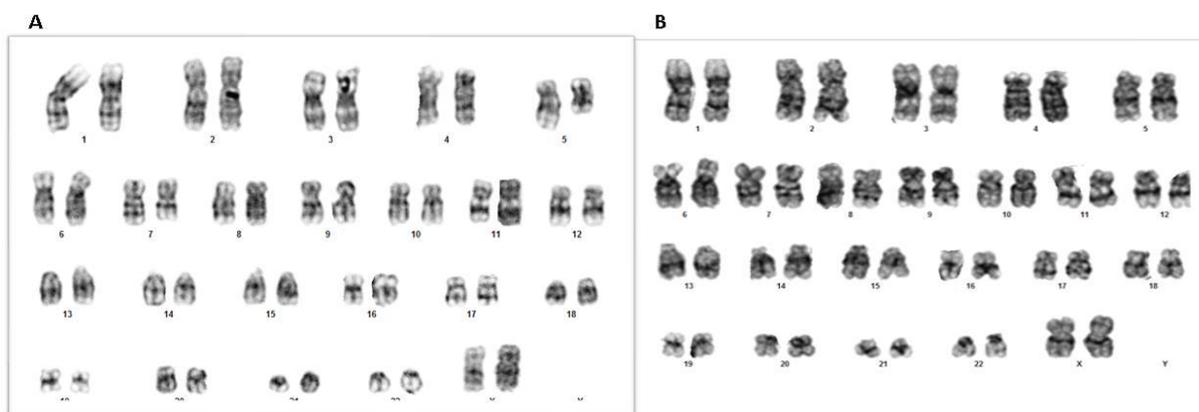
3.4 Cariótipo por Banda G

A amostra para avaliação de cariótipo citogenética clássica (Figura 9) é obtida por hematologista experiente através de perfuração e sucção no osso esterno, com agulha apropriada, em seringa heparinizada, após explicação e assinatura do TCLE. As amostras devem ser centrifugadas (1811xg por 15 minutos a 4°C) para separação da camada leucocitária, que é levada para cultura celular em dois frascos, contendo cada um 7 mL de meio RPMI 1640 (pH 7,0), 3 mL de soro fetal bovino e 100µL de L-glutamina.

O material foi cultivado por 24 horas em estufa com CO₂ a 37°C, sendo adicionados 50 µL de colchicina 30 minutos antes do término da cultura (Colcemid®). Em seguida, o material foi centrifugado e ressuspenso em solução hipotônica de KCl 0,075 M e fixado em solução de metanol e ácido acético (3:1), por 3 vezes.

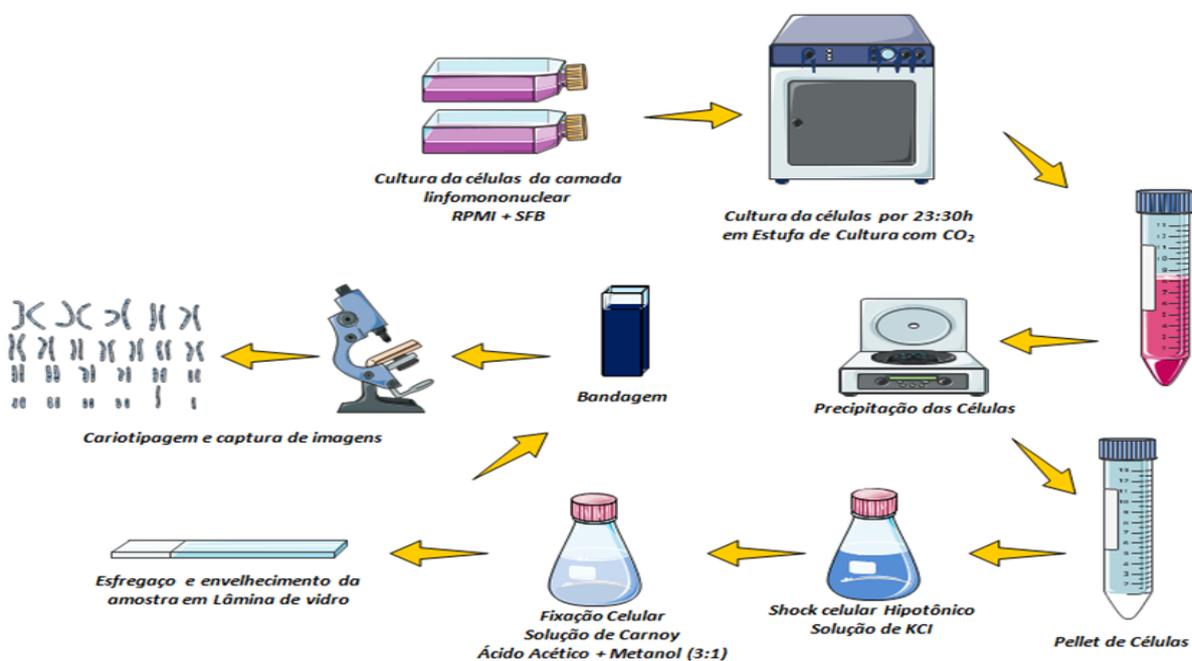
Para visualização das metáfases, este material é gotejado em lâminas, secas ao ar. A coloração foi feita utilizando a técnica de tripsina-Giemsa (GTG), sendo analisadas pelo menos 20 metáfases, sempre que possível, e os cromossomos classificados de acordo com o Sistema Internacional de Nomenclatura Citogenética Humana - ISCN 2016. As imagens das metáfases foram capturadas com o sistema Cytovision (Fig.9). Esquema de todo o processo de citogenética na Fig.10.

Figura 9 - Cariótipos obtidos por citogenética clássica, ambos do sexo feminino, com uma del(5q) em A e normal em B



Fonte: Dados do estudo.

Figura 10 - Esquema de processamento do material de medula óssea para cariotipagem, da cultura à captura de imagens



Fonte: Dados do estudo.

3.5 Análise de Metilação por Pirosequenciamento

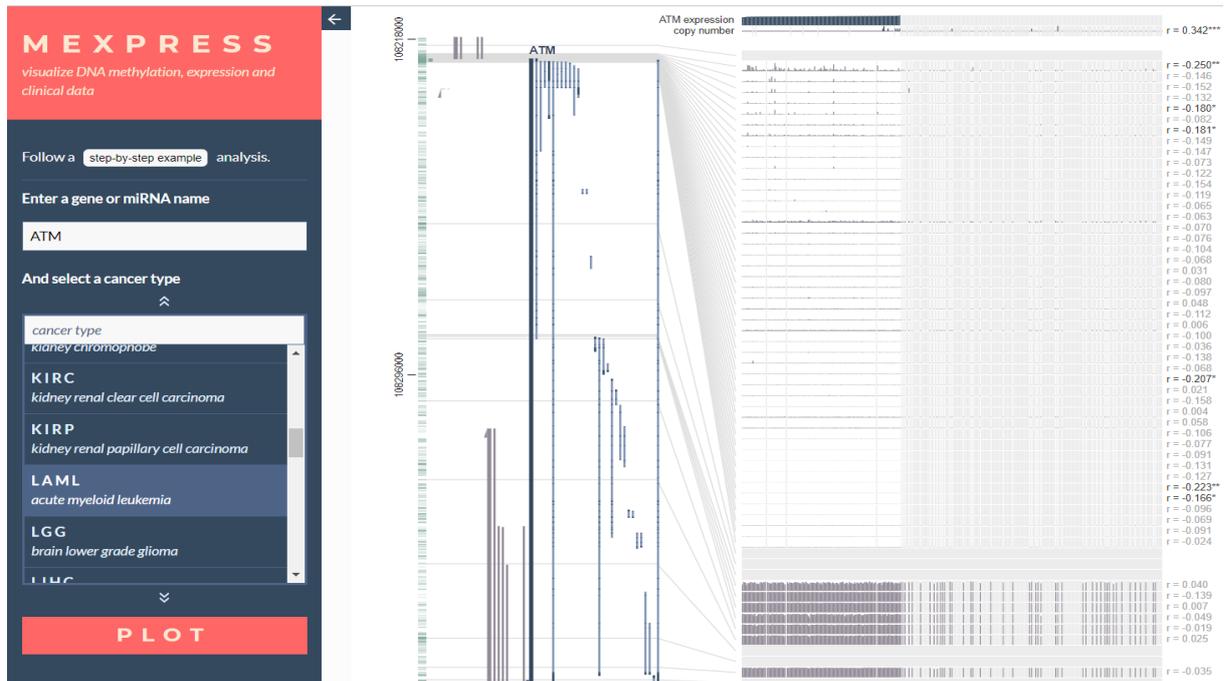
3.5.1 Escolha das regiões para análise

Estes experimentos foram realizados em colaboração com o Programa de Carcinogênese Molecular do Instituto Nacional do Câncer. A técnica de pirosequenciamento foi utilizada por permitir a análise quantitativa de metilação do DNA em regiões específicas dos genes de interesse, os chamados *hotspots*, que foram regiões escolhidas devido às já conhecidas correlações entre padrões de metilação e alterações na expressão gênica, provenientes da plataforma online TCGA (sigla em inglês para “*The Cancer Genome Atlas Program*”).

Neste site, estão publicados dados genômicos sobre 33 tipos de cânceres, analisados com ferramentas de bioinformática, e que auxiliam no entendimento dos processos oncogênicos e padrões de sinalização. Dados sobre síndrome mielodisplásica não estão disponíveis no site; dessa forma, as informações utilizadas para escolher as sequências analisadas neste estudo foram obtidas das informações de metilação e expressão gênica para leucemia mieloide aguda, a doença oncohematológica disponível na plataforma com características mais semelhantes à SMD.

A visualização de correlação entre metilação e expressão gênica, nas diversas regiões dos genes, é obtida no site MEXPRESS (<https://mexpress.be/>), a partir dos dados do TCGA (Figura 11).

Figura 11 - Visualização do site MEXPRESS, com dados de correlação entre metilação e expressão, oriundos do TCGA, para o gene ATM, em Leucemia Mielóide Aguda.



Fonte: <https://mexpress.be/>

Após escolha do ponto cg, foi feita a verificação de que o sítio de fato estava localizado em uma ilha CpG, através do software Methprimer. Na figura 12, vê-se a região genômica analisada para o gene BRCA1, com a identificação da ilha CpG de acordo com a plataforma UCSC genome e a verificação da ilha CpG utilizando o Methprimer.

Figura 12 - Região genômica analisada para o gene *BRCA1*

Legenda: (A) Identificação da ilha CpG de acordo com a plataforma UCSC genome. No quadrado vermelho está apresentado o sítio CG selecionado. (B) Confirmação da ilha CpG utilizando o Methprimer, evidenciando a sequência genômica; em azul os sítios CGs e o sítio CG15419295 relacionado com a expressão em vermelho. Em amarelo a região sequenciada e, sublinhadas, as sequências dos primers.

3.5.2 Modificação com bissulfito de sódio

O objetivo desta etapa é a conversão por desaminação das citosinas não-metiladas em uracilas, que na amplificação por PCR serão lidas como timinas; as citosinas metiladas não sofrem modificação. Para esse processo, utilizou-se o EZ DNA Methylation Kit (ZymoResearch), seguindo as recomendações do fabricante, para a modificação de 500 ng de DNA genômico.

Inicialmente, prepara-se o reagente de conversão (CT), a partir da adição ao

de 750 μL de água ultrapura e 210 μL do tampão M-Dilution ao tubo contendo o conteúdo liofilizado; a homogeneização é realizada no vórtex por 10 a 30 minutos. O tampão de lavagem, M-Wash, apresenta-se em frasco contendo 6 mL de reagente, ao qual deve ser adicionado 24 mL de álcool absoluto.

Adiciona-se 5 μL de M-Dilution à amostra de DNA e o volume é ajustado para 50 μL com água ultrapura, o qual segue para incubação a 37°C por 15 minutos. Após a incubação, adiciona-se 100 μL do CT, e o tubo é submetido à incubação no termociclador Veriti (Applied Biosystems) a 95 °C por 30 segundos e 50 °C por 60 minutos, por 16 ciclos. Após essa ciclagem, as amostras são mantidas a 4 °C por, no mínimo, 10 minutos.

Finalizada a incubação, adiciona-se 400 μL do tampão de ligação M-Binding, e o conteúdo é centrifugado a 10.000 x g por 30 segundos, em coluna de 2 mL fornecida pelo fabricante; o sobrenadante é descartado. Adiciona-se 100 μL de tampão de lavagem M-Wash à coluna, que é centrifugada novamente a 10.000 x g por 30 segundos, seguido da adição de 200 μL do tampão de dessulfonação M-Desulphonation, sendo o tubo então incubado à temperatura ambiente (20-30°C) durante 15 a 20 minutos. Ao final, centrifuga-se a 10.000 x g por 30 segundos e o conteúdo da coluna é lavado duas vezes com 200 μL de tampão de lavagem M-Wash, centrifugando a 10.000 x g por 30 segundos após cada adição de tampão.

A coluna é então transferida para um tubo de 1,5 mL fornecido pelo fabricante, e adiciona-se 20 μL do tampão de eluição (M-Elution), no centro da coluna, seguida de centrifugação a 10.000 x g por 30 segundos para eluição do DNA modificado (concentração final de 25 ng/ μL), que deve ser armazenado a -20°C se não for imediatamente utilizado.

3.5.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR Convencional) e Eletroforese

Após tratamento do DNA genômico com bissulfito de sódio, o DNA modificado foi amplificado utilizando primers específicos para cada gene de interesse (Os primers para cada gene e suas respectivas condições de PCR para amplificação das ilhas CpG nos fragmentos de DNA estão descritos na Tabela 5.

As condições para PCR são obtidas através da etapa de padronização, na qual realiza-se uma curva de temperatura e, se necessário, testa-se diferentes quantidades dos demais reagentes da PCR, a fim de obter a temperatura e concentração ideal de reagentes para que ocorra o anelamento correto dos primers.

Para a reação de PCR foram utilizados os reagentes: enzima Platinum™ *Taq* DNA Polymerase 2U (Invitrogen), tampão (1x PCR Buffer), desoxirribonucleotídeos trifosfato (dNTPs – 0,2 mM de cada), MgCl₂ (cofator da enzima; 1,5mM) e primers (0,2 μM de cada), DNA convertido (25 ng) e H₂O até completar o volume de 50 μL.

O mix de reagentes deve ser preparado em fluxo laminar previamente higienizado com álcool 70% e exposto à luz UV por 15 a 30 minutos. A adição do DNA modificado é realizada na bancada, o volume final contendo reagentes e amostra é 50 μL, e os microtubos são levados para amplificação no termociclador Veriti (Applied Biosystems), seguindo as condições estabelecidas para cada gene.

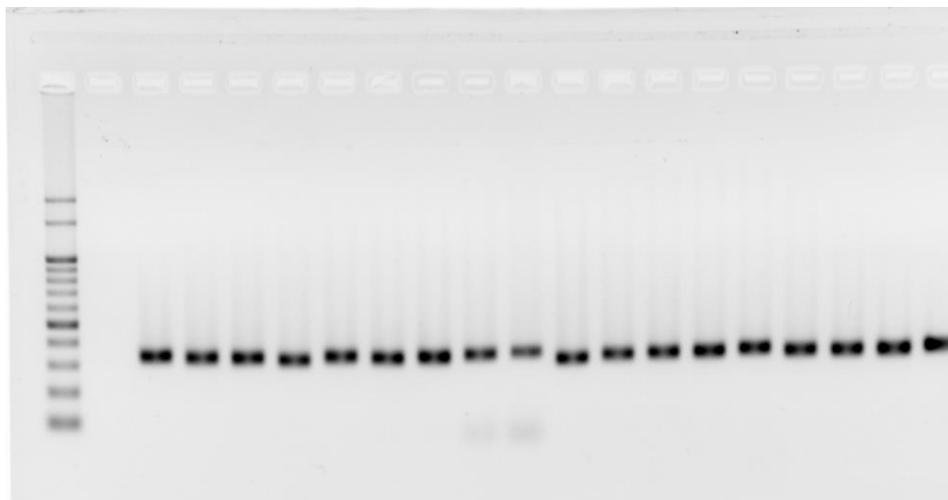
A cada preparação de reagentes para realização da PCR incluiu-se um microtubo como controle negativo, o qual continha toda a mistura de PCR, exceto o DNA genômico, que é substituído por água ultrapura para completar o volume final de reação (50 μL).

Após finalizada a PCR, realiza-se a confirmação da amplificação através de eletroforese com gel de agarose a 2%, para separação dos produtos da reação de acordo com seus pesos moleculares. No primeiro poço do gel é adicionado o padrão (100 pB DNA Ladder, Promega); no segundo, o controle negativo; e nos demais, os produtos de PCR contendo as amostras.

Para visualização das bandas, o gel foi revelado no aparelho de detecção de

quimioluminescência de luz visível, *ChemiDoc* (Bio Rad®) (Figura 13).

Figura 13 - Gel de eletroforese revelado no *ChemiDoc*, para o gene *RAD51* (296 pb), com padrão no primeiro poço, controle negativo no segundo e amostras nos demais.



Fonte: Dados do estudo.

Tabela 5 - Primers e condições de PCR

Genes	Primers	T(°C)	Amplicon (pb)	Sequência analisada	Condições da PCR	Mix (µL por reação)
ATM	Foward TGGTAGTTTGGTAATTTAGTTGAGT	(5'-3'):	260	C/TGGTAATTATAGTTTTAAATA TGGTTTTTTAGT	95°C por 15 minutos	H2O: 36,5 Buffer: 5 dNTP: 1 MgCl2: 4 Primers: 1 Taq Platinum: 0,5 Amostra: 1
	Reverse biotina ACCCTCCAAAAACATACTAACAAT	(5'-3'):			95°C por 40 segundos	
BRCA1	Foward (5'-3'): ATTTAGAGTAGAGGGTGAAGG	(5'-3'):	229	C/TGAGTTTAC/TGTC/TGC/TGT AGTC/TGTAGT	56°C por 40 segundos (50 ciclos)	H2O: 38,8 Buffer: 5 dNTP: 1 MgCl2: 2 Primers: 1 Taq Platinum: 0,2 Amostra: 1
	Reverse biotina ATCCCTCCCATCCTCTAATT	(5'-3'):			72°C por 40 segundos	
BRCA2	Foward GTGAGGGGATAGATTTGTGAT	(5'-3'):	232	ACCA/GAAATAAACTAACAAA AACCRGA/GCCA/GATCACAAA TCTATCCCCTCAC	72°C por 10 minutos	H2O: 38,8 Buffer: 5 dNTP: 1 MgCl2: 2 Primers: 1 Taq Platinum: 0,2 Amostra: 1
	Reverse biotina AACAAAAACCTTTCTCTCAAACATA	(5'-3'):			95°C por 15 minutos	
LIG4	Foward ATTATTTTTTTTAGTTTAGGGGT	(5'-3'):	295	C/TGGC/TGGC/TGTGGGTTTC/T GGTTTTTTG	95°C por 40 segundos	H2O: 37,8 Buffer: 5 dNTP: 1 MgCl2: 3 Primers: 1 Taq Platinum: 0,2 Amostra: 1
	Reverse biotina AAAAACCAAAATCCCTAAATC	(5'-3'):			56°C por 40 segundos (50 ciclos)	
RAD51	Foward GGAAGTTTGGTTGTGATATTAATAGT	(5'-3'):	296	TC/TGGTTAGGAC/TGTAGGTG GGC/TGAGGAC/TGAGTC/TGC/ TGGTTTTGGAGGGTTTAGTTT G	72°C por 10 minutos	H2O: 38,8 Buffer: 5 dNTP: 1 MgCl2: 2 Primers: 1 Taq Platinum: 0,2 Amostra: 1
	Reverse biotina CAAACCTAAACCTCCAAA	(5'-3'):			95°C por 15 minutos	
	Sequência: GTTGAGTATTGGA				95°C por 40 segundos	

3.5.4 Princípio do pirosequenciamento e análise de metilação de sítios CpG

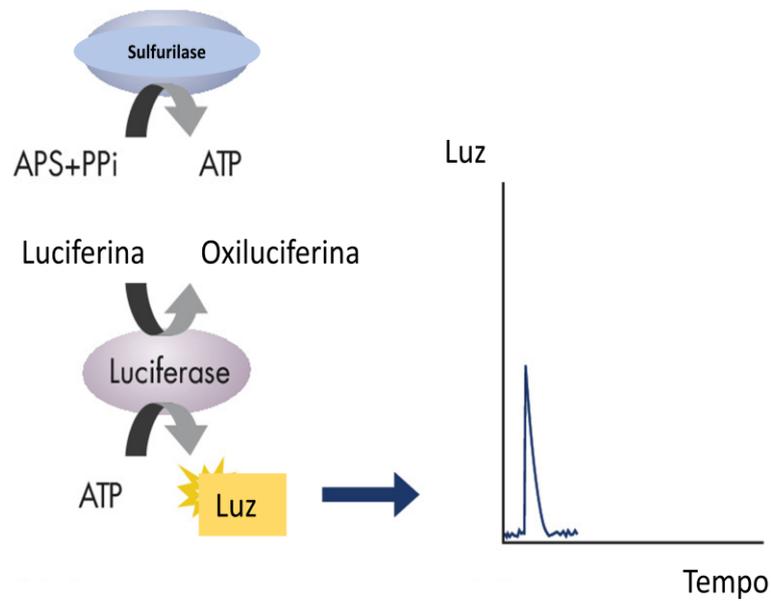
Confirmada a amplificação, o produto da PCR é levado para sequenciamento no aparelho *PyroMark Q96* (Qiagen®). Essa técnica envolve a atuação de quatro enzimas: DNA polimerase I, ATP sulfúrilase, luciferase e apirase, além de seus substratos (adenosina fosfossulfato (APS) e luciferina) e o DNA molde.

A técnica de pirosequenciamento baseia-se no sequenciamento por síntese, onde há a adição e incorporação sequencial de nucleotídeos. O nucleotídeo só é incorporado pela DNA polimerase se for complementar à fita molde, sendo que essa incorporação pode ser monitorada em tempo real (DEJEUX *et al.*, 2009).

No pirosequenciador, o primeiro desoxirribonucleotídeo trifosfato (dNTP) injetado é pareado. Caso seja complementar, será incorporado à fita pela DNA polimerase I e há a liberação do pirofosfato (PPi), utilizado pela enzima ATP sulfúrilase para converter o PPi em ATP na presença de adenosina 5'-fosfossulfato (APS).

O ATP é utilizado pela enzima luciferase na conversão de luciferina em oxiluciferina e luz em uma intensidade proporcional à quantidade de ATP. A luz produzida é captada pelo sistema e visualizada como um pico no gráfico Luz vs. Tempo, com a altura de cada pico sendo proporcional à quantidade de nucleotídeos incorporados (Figura 14). Ao mesmo tempo, a enzima apirase está degradando os nucleotídeos não incorporados e o ATP. E assim, a etapa é terminada e um novo nucleotídeo é adicionado segundo a sequência fornecida ao software do equipamento.

Figura 14 - Incorporação do nucleotídeo gera luz, vista como um pico no pirograma.



Fonte: <https://www.qiagen.com/us/service-and-support/learning-hub/technologies-and-research-topics/pyrosequencing-resource-center/technology-overview/#principle>

Os níveis de metilação dos sítios CpG de interesse são então avaliados a partir da conversão dos pirogramas em valores numéricos correspondentes às alturas dos picos obtidos (Figura 15) e calculando a média de todos os sítios CpG analisados para um promotor específico (VAISSIÈRE *et al.*, 2009).

correspondentes às alturas dos picos obtidos e, para as análises estatísticas, calculou-se a média de todos os sítios CpG analisados para cada região de interesse dos genes

3.6 Análise estatística

Para verificação da normalidade dos dados, foi realizado o teste de Shapiro-Wilk, visto que a divisão dos indivíduos para comparações resultou em grupos com $n < 50$. Constatada a não-normalização dos grupos, mesmo após retirada de *outliers*, foram realizados testes não-paramétricos, Mann-Whitney U para comparação de dois grupos, ou Kruskal-Wallis 1-way ANOVA para comparações entre mais de dois grupos.

Para avaliação da correlação entre dados de Metilação e de expressão gênica (estes previamente obtidos em estudos anteriores do grupo), ou seja, se há associação entre os fenômenos, foi realizado o teste de correlação de Spearman, cujos valores 0,10 a 0,3 indicam correlação fraca; entre 0,4 e 0,6 indicam correlação moderada, e quando entre 0,7 e 1 apontam correlação forte (Dancey e Reidy, 2005).

As análises foram realizadas utilizando o *software* IBM SPSS *Statistics* 21, para *Windows*. O nível de significância estatística considerado para todos os testes foi $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Pacientes com Síndrome Mielodisplásica

4.1.1 Caracterização dos pacientes

A população amostral de pacientes incluídos neste estudo foi de 56 indivíduos, todos com SMD *de novo*, com discreta maioria do sexo feminino (53,5%). A variável idade seguiu, primeiramente, a categorização sugerida por Greenberg *et al.* (2012), com maior predominância de pacientes entre 71 e 80 anos (30,7%) e ≤ 60 anos (28,8%). Os demais valores estão demonstrados na tabela 6.

Tabela 6 - Caracterização descritiva das variáveis sociais dos pacientes

VARIÁVEIS		Nº	%
Gênero	Feminino	30	53,5%
	Masculino	26	46,4%
Idade	≤ 60 anos	15	28,8%
	>60 - ≤ 70 anos	11	21,1%
	>70 - ≤ 80 anos	16	30,7%
	>80 anos	10	19,2%
Idade (categorizada)	≤ 60 anos	15	28,8%
	> 60 anos	37	71,1%

Fonte: Dados do estudo.

Em relação à classificação diagnóstica, os pacientes foram categorizados em seis subtipos de SMD, a maioria deles apresentaram-se com SMD-DM (44,6%) e, em menor número, SMD-SA-DU (5,3%). Agrupando os subtipos em formas iniciais e avançadas (SMD-EBI e SMD-EBII), 17,8% apresentou-se com doença de mais alto grau (Tabela 7).

Tabela 7 Caracterização diagnóstica dos pacientes pela classificação da OMS (2016)

VARIÁVEIS		Nº	%
Classificação da OMS	SMD-SA-DU	03	5,3%
	SMD-DU	09	16,0%
	SMD-DM	25	44,6%
	SMD-SA-DM	09	16,0%
	SMD-EBI	04	7,1%
	SMD-EBII	06	10,7%
Formas da SMD	Iniciais	46	82,1%
	Avançadas	10	17,8%

Fonte: Dados do estudo.

Na avaliação de classificação de risco dos pacientes, seguindo o IPPS-R, nenhum dos pacientes era de risco muito alto; para risco alto e moderado a quantidade foi a mesma (10,7%); e a maioria deles era de risco baixo ou muito baixo (26,7% e 23,2%, respectivamente). Em relação à avaliação citogenética, 40% dos pacientes apresentaram cariótipo alterado, e 60% cariótipo normal (Tabela 8).

Tabela 8 - Caracterização dos pacientes de acordo com cariótipo e classificação de risco do IPSS-R.

VARIÁVEIS		Nº	%
Cariótipo	Normal	24	42,8%
	Alterado	16	28,6%
	Ausência de metáfases	9	16,1%
	Não informado	7	12,5%
Classificação do grupo de risco de acordo com o IPSS-R	Muito baixo (≤ 1.5)	13	23,2%
	Baixo ($> 1.5-3$)	15	26,7%
	Intermediário ($> 3-4.5$)	06	10,7%
	Alto ($> 4.5-6$)	06	10,7%
	Muito alto (> 6)	00	0,0%

Fonte: Dados do estudo.

Na análise das demais variáveis avaliadas no diagnóstico de SMD, 84,8% dos pacientes apresentou hiperplasticidade na biópsia de medula óssea; 70,9% dos indivíduos não apresentou fibrose medular; e foram observadas displasias em uma (26,0%), duas (41,3%) e três (32,6%) linhagens celulares. A displasia mais prevalente foi a diseritropoese (89,7%), seguida de dismegacariopoese (69,3%) e disgranulopoese (46,9%). A maioria dos pacientes não apresentou sideroblastos em anel (62,5%), no entanto, 37,5% tinha uma contagem de $\geq 15\%$ a $< 50\%$ desses elementos. Quanto à porcentagem de blastos na medula óssea, 79,5% apresentou até 2% na contagem, enquanto 9% dos pacientes tinha mais que 10%, sendo estas as duas faixas extremas da classificação. Todas as demais categorias estão demonstradas na Tabela 9.

Tabela 9 - Caracterização descritiva das variáveis clínicas de análise da medula óssea de pacientes com SMD.

VARIÁVEIS		Nº	%
Celularidade da medula óssea	Hipocelular	02/33	6,0%
	Normocelular	03/33	9,0%
	Hiper celular	28/33	84,8%
Fibrose na medula óssea	Ausência	22/31	70,9%
	Presença	09/31	29,1%
Displasias na medula óssea	1	12/46	26,0%
	2	19/46	41,3%
	3	15/46	32,6%
Diseritropoese	Presença	44/49	89,7%
	Ausência	5/49	10,2%
Dismegacariopoese	Presença	34/49	69,3%
	Ausência	15/49	30,6%
Disgranulopoese	Presença	23/49	46,9%
	Ausência	26/49	53,0%
Presença de Sideroblastos em anel	0%	25/41	62,5%
	≥1% - ≤14%	01/41	2,5%
	≥15% - <50%	15/41	37,5%
Faixas das percentagens de blastos	≤2%	35/44	79,5%
	>2 a <5%	03/44	6,8%
	>5% - ≤10%	02/44	4,5%
	>10%	04/44	9,0%

Fonte: Dados do estudo.

Quanto aos achados clínicos do sangue periférico, apenas sete pacientes (13,7%) apresentaram taxa de hemoglobina ≥ 10 g/dL, os demais, 86,3%, apresentaram valores abaixo dessa faixa. Em relação à contagem de neutrófilos, categorizada em $<800/\text{mm}^3$, 75,3% dos pacientes estavam acima dessa faixa, e 24,7% abaixo. Na categorização de número de plaquetas, 57,3% apresentou contagem $\geq 100.000/\text{mm}^3$ e 42,7% tinham abaixo de 100.000. Cinco pacientes (14,2%) apresentaram evolução para LMA (Tabela 10).

Tabela 10 - Caracterização descritiva das variáveis clínicas de achados de sangue periférico dos pacientes com SMD.

VARIÁVEIS		Nº	%
Classificação dos valores de hemoglobina (Hb)	≥ 10g/dL	07	13,7%
	<10g/dL	44	86,3%
Classificação dos valores de neutrófilos (ANC)	≥800/mm ³	27	75,3%
	<800/mm ³	25	24,7%
Classificação dos valores de plaquetas	≥100.000/mm ³	24	57,3%
	≥50.000 - <100.000/mm ³	15	22,0%
	<50.000/mm ³	12	20,7%
Classificação dos valores de plaquetas (categorizada)	≥100.000	24	57,3%
	<100.000	28	42,7%
Evolução pra LMA		05	14,2%

Fonte: Dados do estudo.

A tabela 11 apresenta os resultados de cariótipos de 40 pacientes com SMD; para os outros 16 não houve crescimento celular, com o resultado da cariotipagem sendo “ausência de metáfases”.

Tabela 11 - Descrição dos cariótipos de 40 pacientes com SMD

Paciente	Sexo/Idade	Cariótipo - ISCN 2016	OMS
1	F/28	46 XX [20]	SMD-SA-DU
2	M/24	46 XY [9]	SMD-DM
3	F/81	46,X,i(X)(q10),del(17)(q22q23.3)[7]/46,XX[13]	SMD-DU
4	F/78	46,XX,del(5)(q12q33)[18]/46,XX[2]	SMD-DU
5	F/45	46,XX[7]	SMD-DU
6	M/85	46,XY[15]	SMD-SA-DM
7	M/47	47,XY,+mar[5]/46,XY,del(5)(q31)[5]/46,XY[15]	SMD-DM
8	M/31	46,XY[24]	SMD-DM
9	M/55	46,XY[15}	SMD-DM
10	M/52	46,XY[20]	SMD-DM
11	F/65	46,XX[20]	SMD-DM
12	M/91	46,X-Y[4]/46,XY[16]	SMD-SA-DU
13	F/77	46, XX [15]	SMD-DU
14	F/56	46, XX [11]	SMD-SA-DM
15	M/60	47,XY,+15[10]/46,XY[10]	SMD-DM
16	M/45	47,XY,+mar[3]/46,XY[17]	SMD-DM
17	M/67	46,XY[20]	SMD-EB1
18	M/89	46,XY[17]	SMD-EB2
19	M/82	46,XY[20]	SMD-SA-DM
20	M/89	46,XY,del(5)(q31q35)[6]/46,XY[17]	SMD-DM
21	F/73	46,XX [25]	SMD-DM
22	M/69	46,XY,del(5)(q15q33)[7]/46,XY[11]	SMD-DU
23	M/66	47,XY,+mar[5],46,XY[11]	SMD-DM
24	M/77	46,XY,add(13)(p11)[12]/46,XY,del(7)(q32),add(13)(p11)[4]]/48,XY,add(13)(p11),+22,+mar[9]/48,XY,del(7)(q32),add (13)(p11),+22,+mar[3]/46,XY[2]	SMD-DM
25	M/46	46, XY[8]	SMD-DM
26	M/71	del 5	SMD-EB1
27	F/64	46 XX [20]	SMD-DU
28	F/72	46,XX[25]	SMD-SA-DM
29	F/88	46, XX[20]	SMD-SA-DM
30	F/41	46,XX,del(5)(q15q33)[9]/46,XX,del(5)(q15q33),del(11)(? q25)[7]/46,XX[4]	SMD-DM
31	F/73	46 XX [10]	SMD-DM
32	F/56	46,XX[10]	SMD-DU
33	F/88	47,XX,+22[4]/46,XX[16]	SMD-DM
34	F/81	46,XX[5]	SMD-SA-DM
35	F/46	46,XX[8]	SMD-DU
36	F/87	47,XX,t(4;11)(q27;q32),+mar[4]/46,XX[16]	SMD-DM
37	F/77	46,XX[3]	SMD-DM
38	F/80	46,XX[20]	SMD-SA-DM
39	F/62	92~105<4n>..XX[3]/46,XX,del(5)(q32q33)[5]/46,XX[12]	SMD-DU
40	M/80	45,X,-Y[18]/46,XY[7]	SMD-SA-DM

Fonte: Dados do estudo.

4.1.2 Análise de metilação dos genes de reparo de fita dupla em pacientes com SMD

4.1.2.1 Variáveis

Na análise de metilação em pacientes com SMD, o gene *ATM* foi o único que apresentou resultados significantes, para as seguintes variáveis (Figura 15): Sexo ($p = 0,037$), estando maior no sexo masculino (medianas: masculino = 3,3350 e feminino = 2,0200); Idade ($p = 0,002$), estando maior nos pacientes com idade até 60 anos (medianas: <60 anos = 4,3100 e >60 anos = 2,2100) ; e progressão para LMA ($p = 0,016$), estando maior nos pacientes que progrediram (medianas: progressão = 4,9700 e sem progressão = 2,4550). Dos 5 pacientes que evoluíram para LMA, 4 eram do sexo masculino, 2 tinham menos de 60 anos, 4 apresentavam neutrófilos < 1.800 (dependência transfusional), apenas um tinha plaquetas < 50.000, dois apresentavam aumento de blastos (9,6% e 17%), dois eram de formas avançadas (SMD-EB-II) enquanto os outros três classificados de risco baixo ou muito baixo, e três tinham cariótipo normal (Tabela 12).

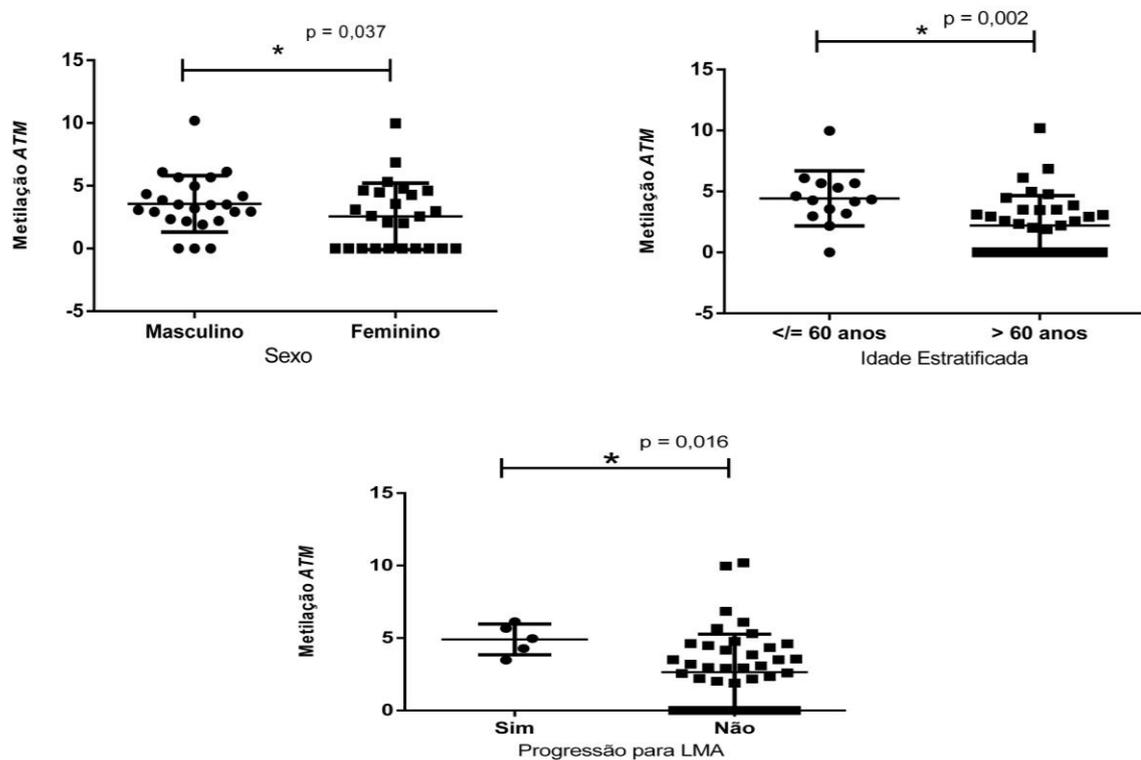
Tabela 12 - Dados clínico-laboratoriais dos 5 pacientes que evoluíram para LMA.

Sexo	Idade	Hb	Neutrófilos	Plaquetas	Celularidade	Fibrose	Diseritro	Disgranulo	Dismega	%Blastos	WHO 2016	Risco (IPSS_R)	Cariótipo
M	68	5,61	<1.800	24000	Hiper celular	Nao	Sim	Nao	Sim	17	SMD-EB2	ND	ausência de metáfase
M	89	7,7	>=1.800	248000	Hiper celular	Nao	Sim	Sim	Sim	0	SMD-DM	Baixo	46,XY,del(5)(q31q35)[6]/46,XY[17]
M	46	8,1	<1.800	130000	Hiper celular	Nao	Sim	Sim	Sim	ND	SMD-DM	Baixo	46,XY[8]
F	56	6,68	<1.800	537000	Hiper celular	Sim	Sim	Nao	Nao	2	SMD-DU	Muito baixo	46 xx [10]
M	89	6,2	<1.800	55930	ND	ND	Sim	Nao	Nao	9,6	SMD-EB2	Alto	46 xy [17]

Fonte: Dados do estudo.

Na tabela 13a estão os resultados de análise de variáveis para os genes *ATM* e *BRCA2*; e na tabela 13b, estão os resultados de análise de variáveis para os genes *BRCA1*, *LIG4* e *RAD51*, cujos valores de p não apresentaram significância e as medianas, na quase totalidade, foram iguais a zero.

Figura 15 - Gráficos das análises de metilação para o gene *ATM*, em relação aos parâmetros sexo, idade e progressão para LMA, que apresentaram valores de $p < 0,05$.



		Metilação <i>ATM</i>			
		Mediana (mínimo-máximo)	N	p	Desvio Padrão
Gênero	Feminino	2,0200 (,0000 - 9,970)	29	0,037	2,6106
	Masculino	3,3350 (,0000 - 10,1900)	24		
Idade	≤ 60 anos	4,3100 (,0000 - 9,9700)	14	0,002	2,2625
	>60 anos	2,2100 (,0000 - 10,1900)	35		
Evolução para LMA	Sim	4,9700 (3,4800 - 6,1300)	5	0,016	1,062
	Não	2,4550 (,0000 - 10,1900)	30		

Fonte: Dados do estudo.

Tabela 13a - Análise de metilação em relação às variáveis, em pacientes com SMD, para os genes *ATM* e *BRCA2*

		Metilação <i>ATM</i>				Metilação <i>BRCA2</i>			
		Mediana (mínimo-máximo)	N	p	Desvio Padrão	Mediana (mínimo-máximo)	N	p	Desvio Padrão
Gênero	Feminino	2,0200 (,0000 - 9,970)	29	0,037	2,6106	,2650 (,0000 - 1,3425)	26	0,595	0,3097
	Masculino	3,3350 (,0000 - 10,1900)	24		2,2503	,3200 (,1175 - 1,3225)	23		0,3239
Idade	≤ 60 anos	4,3100 (,0000 - 9,9700)	14	0,002	2,2625	,2775 (,1200 - 1,3225)	13	0,626	0,3454
	>60 anos	2,2100 (,0000 - 10,1900)	35		2,4486	,2800 (,0000 - 1,3425)	33		0,2968
Celularidade	Hipocelular	3,1900 (3,1900 - 3,1900)	1	0,758		,1200 (,1200 - ,1200)	1	0,429	
	Normocelular	,0000 (,0000 - 5,6700)	3		3,2736	,2650 (,1075 - ,7050)	3		0,3097
	Hiper celular	2,5800 (,0000 - 10,1900)	26		2,5692	,2650 (,0000 - ,9300)	23		0,247
Diseritropoiese	Sim	2,9400 (,0000 - 10,1900)	41	0,152	2,6217	,2938 (,0000 - 1,3425)	38	0,308	0,292
	Não	,0000 (,0000 - 6,0900)	5		2,7235	,1575 (,1075 - 1,3225)	5		0,5282
Disgranulopoiese	Sim	3,0550 (,0000 - 6,1300)	20	0,892	2,1315	,3150 (,1175 - ,9300)	21	0,496	0,2584
	Não	2,5800 (,0000 - 10,1900)	26		3,0482	,2263 (,0000 - 1,3425)	22		0,3738
Dismegacariopoiese	Sim	2,9200 (,0000 - 10,1900)	31	0,952	2,9547	,2838 (,0000 - ,9300)	30	0,667	0,2746
	Não	2,6000 (,0000 - 6,0900)	15		2,0092	,2800 (,1275 - 1,3425)	13		0,4139
Hemoglobina	≤ 8 g/dL	3,4800 (,0000 - 6,8500)	25	0,355	2,144	,2663 (,0000 - ,9300)	24	0,056	0,2121
	> 8 g/dL	2,2100 (,0000 - 10,1900)	23		3,0799	,3325 (,1075 - 1,3425)	21		0,3731
Dependência transfusional	Sim	3,0800 (,0000 - 6,8500)	27	0,176	2,2038	,3063 (,0000 - ,9300)	26	0,79	0,2713
	Não	,9500 (,0000 - 10,1900)	16		2,8545	,2788 (,1200 - 1,3425)	14		0,3337
Neutrófilos	< 1800	3,0250 (,0000 - 5,6700)	22	0,581	1,9375	,2713 (,1075 - ,9100)	22	0,482	0,214
	≥ 1800	2,6000 (,0000 - 10,1900)	27		3,0174	,2738 (,0000 - 1,3425)	24		0,3646
Plaquetas	< 50000	3,0550 (,0000 - 9,9700)	10	0,812	3,0706	,3150 (,1200 - ,9100)	9	0,856	0,3295
	≥ 50000	2,7700 (,0000 - 10,1900)	38		2,5105	,2788 (,0000 - 1,3425)	36		0,3117
Cariótipo	Normal	3,2250 (,0000 - 6,8500)	24	1	2,2155	,2775 (,0000 - 1,3225)	21	0,427	0,3206
	Alterado	2,9300 (,0000 - 10,1900)	16		3,3118	,1775 (,1075 - 1,3425)	15		0,3672
Formas de SMD	Iniciais	2,9200 (,0000 - 10,1900)	46	1	2,6061	,2788 (,0000 - 1,3425)	42	0,44	0,3315
	Avançadas	3,1100 (,0000 - 4,9700)	7		2,0563	,3150 (,1175 - ,3775)	7		0,1127
Evolução para LMA	Sim	4,9700 (3,4800 - 6,1300)	5	0,016	1,062	,3200 (,2775 - ,4125)	4	0,476	0,057
	Não	2,4550 (,0000 - 10,1900)	30		2,5239	,2650 (,0000 - 1,3425)	27		0,3247

Fonte: Dados do estudo.

Tabela 13b - Análise de metilação em relação às variáveis, em pacientes com SMD, para os genes *BRCA1*, *LIG4* e *RAD51*, cujas medianas foram zero.

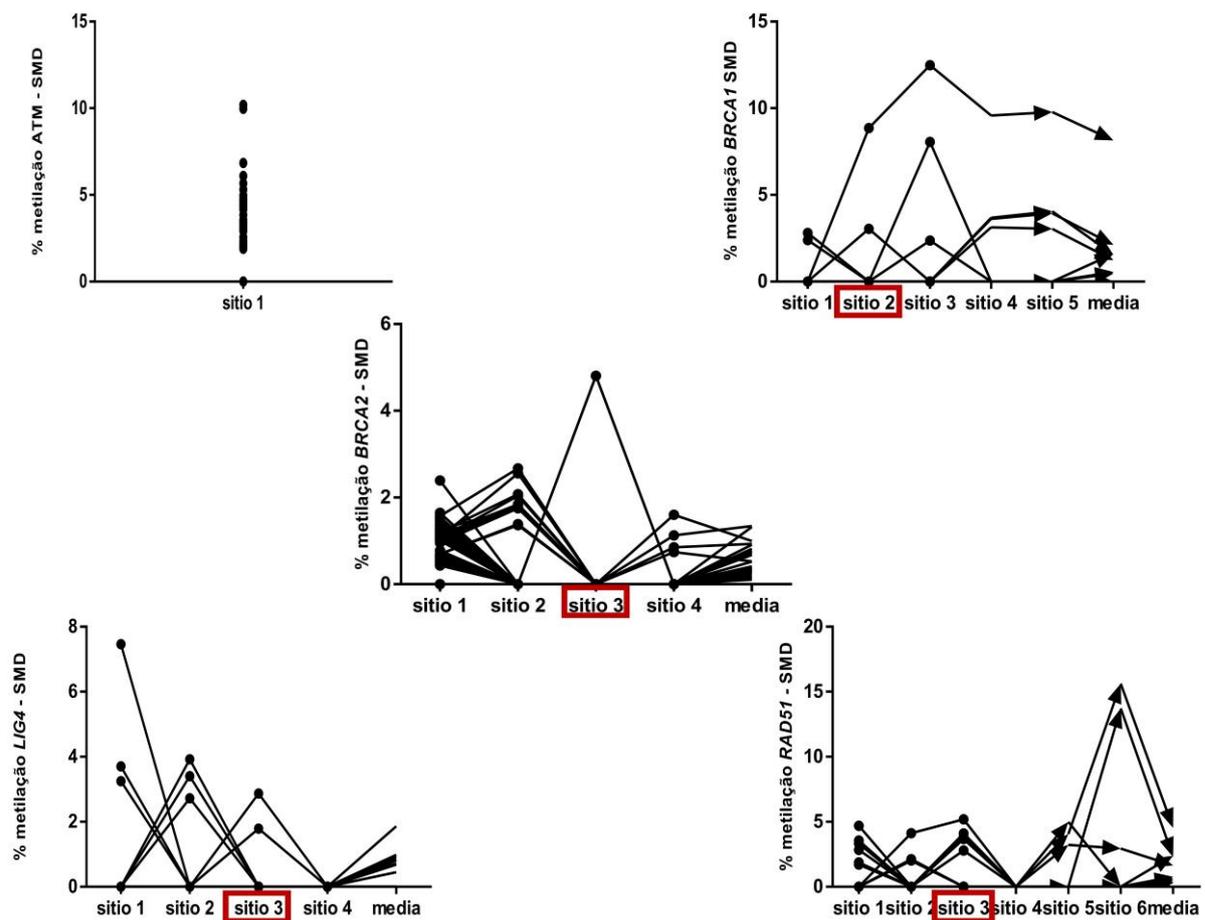
		Metilação <i>BRCA1</i>				Metilação <i>LIG4</i>				Metilação <i>RAD51</i>					
		Mediana (mínimo-máximo)	N	p	Desvio Padrão	Mediana (mínimo-máximo)	N	p	Desvio Padrão	Mediana (mínimo-máximo)	N	p	Desvio Padrão		
Gênero	Feminino	,0000 (,0000 - 1,5500)	25	0,302	0,3336	,0000 (,0000 - 1,8650)	29	0,758	0,408	,0000 (,0000 - 4,5166)	29	0,237	0,9669		
	Masculino	,0000 (,0000 - 8,1400)	23		1,7461	,0000 (,0000 - ,9800)	23		0,313	,0000 (,0000 - 2,2866)	25		0,4851		
Idade	≤ 60 anos	,0000 (,0000 - 1,6100)	14	0,843	0,521	,0000 (,0000 - 1,8650)	14	0,416	0,5292	,0000 (,0000 - ,6417)	14	0,87	0,2183		
	>60 anos	,0000 (,0000 - 8,1400)	30		1,5335	,0000 (,0000 - ,9800)	34		0,286	,0000 (,0000 - 4,5167)	36		0,9311		
Celularidade	Hipocelular	,0000 (,0000 - ,0000)	1	0,376	0,1522	,0000 (,0000 - ,0000)	1	0,781	0,2369	,3117 (,3117 - ,3117)	1	0,999	0,4892		
	Normocelular	,0000 (,0000 - 1,6100)	3			,9295	,0000 (,0000 - ,0000)			3	,4667 (,0000 - 1,6417)			4	0,8459
	Hiper celular	,0000 (,0000 - ,5600)	22			,0000 (,0000 - ,9250)	26			0,3884	,0000 (,0000 - 2,3850)			26	0,8432
Diseritropoiese	Sim	,0000 (,0000 - 8,1400)	37	0,567	1,4059	,0000 (,0000 - 1,8650)	41	0,918	0,3209	,0000 (,0000 - 4,5167)	42	0,802	0,7342		
	Não	,0000 (,0000 - ,0000)	4			,0000 (,0000 - ,7175)	5			0,3209	,0000 (,0000 - 1,6417)			5	0,802
Disgranulopoiese	Sim	,0000 (,0000 - 8,1400)	19	0,13	1,906	,0000 (,0000 - ,9800)	20	0,435	0,3555	,0000 (,0000 - 2,2867)	21	0,397	0,5228		
	Não	,0000 (,0000 - 1,5500)	22			0,346	,0000 (,0000 - 1,8650)			26	0,4008			,0000 (,0000 - 4,5167)	26
Dismegacariopoiese	Sim	,0000 (,0000 - 2,1200)	28	0,945	0,5644	,0000 (,0000 - ,8500)	31	0,111	0,2391	,0000 (,0000 - 2,3850)	32	0,888	0,5202		
	Não	,0000 (,0000 - 8,1400)	13			2,255	,0000 (,0000 - 1,8650)			15	0,5548			,0000 (,0000 - 4,5167)	15
Hemoglobina	≤ 8 g/dL	,0000 (,0000 - 8,1400)	23	0,925	1,7003	,0000 (,0000 - 1,8650)	25	0,071	0,4677	,0000 (,0000 - 2,2867)	26	0,218	0,4807		
	> 8 g/dL	,0000 (,0000 - 2,1200)	20			0,6527	,0000 (,0000 - ,9250)			22	0,1972			,0000 (,0000 - 4,5167)	23
Dependência transfusional	Sim	,0000 (,0000 - 8,1400)	23	0,658	1,7405	,0000 (,0000 - ,9800)	27	0,725	0,3114	,0000 (,0000 - 2,2867)	28	0,658	1,2313		
	Não	,0000 (,0000 - 1,5500)	15			0,4928	,0000 (,0000 - 1,8650)			16	0,5064			,0000 (,0000 - 4,5167)	16
Neutrófilos	< 1800	,0000 (,0000 - 1,6100)	21	0,868	1,8096	,0000 (,0000 - ,9800)	22	0,565	0,2804	,0000 (,0000 - 2,2867)	23	0,641	0,5808		
	≥ 1800	,0000 (,0000 - 2,1200)	23			0,5091	,0000 (,0000 - 1,8650)			26	0,4165			,0000 (,0000 - 4,5167)	27
Plaquetas	< 50000	,0000 (,0000 - 8,1400)	9	0,628	2,717	,0000 (,0000 - ,9800)	9	0,279	0,4549	,0000 (,0000 - 2,2867)	10	1	0,7132		
	≥ 50000	,0000 (,0000 - 1,6100)	34			0,4327	,0000 (,0000 - 1,8650)			38	0,3495			,0000 (,0000 - 4,5167)	39
Cariótipo	Normal	,0000 (,0000 - 1,2300)	19	0,883	0,3035	,0000 (,0000 - 1,8650)	24	0,368	0,4632	,0000 (,0000 - ,6417)	24	0,318	0,2039		
	Alterado	,0000 (,0000 - 2,1200)	16			0,6438	,0000 (,0000 - ,8500)			15	0,2195			,0000 (,0000 - 4,5167)	16
Formas de SMD	Iniciais	,0000 (,0000 - 2,1200)	41	1	0,5049	,0000 (,0000 - 1,8650)	44	0,558	0,3538	,0000 (,0000 - 4,5167)	46	0,542	0,7785		
	Avançadas	,0000 (,0000 - 8,1400)	7			3,0766	,0000 (,0000 - ,9800)			8	0,4412			,0000 (,0000 - 2,2867)	8
Evolução para LMA	Sim	,0000 (,0000 - ,0000)	4	0,498	1,6523	,0000 (,0000 - ,0000)	5	0,477	0,4463	,0000 (,0000 - ,3550)	5	0,766	0,177		
	Não	,0000 (,0000 - 8,1400)	26			1,6523	,0000 (,0000 - 1,8650)			29	0,4463			,0000 (,0000 - 4,5167)	30

Fonte: Dados do estudo.

4.1.2.2 Padrão Gráfico de Metilação

Foi realizada uma análise gráfica para observação visual da variação entre os sítios investigados (Figura 16). O comportamento de variação foi heterogêneo em todos os genes, impossibilitando a formação de padrões bem definidos em que a maioria dos pacientes mostrou valores menores ou maiores em cada sítio. Porém, os *outliers* nos *hotspots* foram verificados e não apresentaram nenhuma característica clínica nitidamente influenciada pelo resultado da metilação.

Figura 16 - Visualização gráfica da variação de metilação nos sítios, entre os pacientes com SMD (em vermelho, os sítios *hotspots*)



Fonte: Dados do estudo.

4.2 Agricultores

4.2.1 Caracterização dos indivíduos

Foram inclusos neste estudo 69 agricultores, residentes na cidade de Limoeiro do Norte, classificados em três grupos: Grande Produtor (“GP”, trabalhadores do agronegócio), Agricultura Familiar (“AF”, pequenos produtores rurais, com agricultura de subsistência) e Agricultura Ecológica (“AE”, segmento agroecológico), sendo os dois primeiros grupos os maiores representantes, com 44,9% e 40,6%, respectivamente; e a agricultura ecológica, com 10 indivíduos, representa 14,5% do universo amostral (Tabela 14).

Os grupos AF e AE são formados integralmente por homens, e o grupo GP possui uma única representante do sexo feminino. A idade média foi de 39,5 anos para o grupo GP, 45,5 anos no grupo AF e 42 anos no grupo AE.

Sobre o tempo de exposição a agrotóxicos devido à natureza ocupacional, os grupos GP e AF apresentaram porcentagens aproximadas, com 77,4% e 71,4%, respectivamente, sofrendo esse tipo de exposição há mais de 12 anos. No grupo GP, a maioria (41,9%) relatou contato indireto, diferentemente do grupo AE, no qual a maioria (50%) relatou contato direto.

Não foram obtidos dados de histórico familiar de câncer no grupo AE; no grupo GP a maioria, 45,7%, informou não ter casos oncológicos na família; e no grupo AF, 28,5% afirmou ter histórico familiar, 25% não tinha, e 46,6% não informou.

Tabela 14 - Características dos grupos de agricultores

PARÂMETROS	GRANDE PRODUTOR	AGRICULTURA FAMILIAR	AGRICULTURA ECOLÓGICA
Número de casos (%)	31/69 (44.9)	28/69 (40.6)	10/69 (14.5)
Idade média (anos)	39.5 (23-64)	45.5 (28-65)	42 (28-56)
Gênero (n/%)			
Masculino	30 (96.0)	28 (100.0)	10 (100.0)
Feminino	1 (3.2)	0 (0.0)	0 (0.0)
Histórico familiar de câncer			
Sim	5 (16.1)	8 (28.5)	-
Não	14 (45.1)	7 (25.0)	-
não informado	12 (38.7)	13 (46.6)	10 (100.0)
Tempo de exposição (n/%)			
≤ 12 anos	3 (9.6)	2 (7.1)	-
> 12 anos	24 (77.4)	20 (71.4)	-
não informado	4 (12.9)	6 (21.4)	-
Tipo de contato (n/%)			
Direto	11 (35.4)	14 (50.0)	-
Indireto	13 (41.9)	3 (10.7)	-
Não informado	7 (22.5)	11 (39.2)	-
PERFIL CITOGENÉTICO (N/%)			
Cariótipo normal	8 (25.8)	6 (21.4)	6 (60.0)
Cariótipo alterado	6 (17.7)	2 (7.1)	1 (10.0)
Ausência de metáfase	6 (17.7)	6 (21.4)	2 (20.0)
Não informado	12 (38.7)	14 (50.0)	1 (10.0)

Fonte: Dados do estudo

Na análise de perfil citogenético (Tabela 13), observou-se que em todos os grupos a maioria dos cariótipos obtidos foram classificados como normais; no entanto, houve um grande número de casos nos quais não foi possível obter o resultado do cariótipo ou não houve crescimento celular suficiente para se observar metáfases. Na tabela 15 estão descritos os resultados dos 29 agricultores que apresentaram metáfases na avaliação de cariótipo.

Tabela 15 - Descrição detalhada do cariótipo de medula óssea de 29 agricultores.

Caso	Idade/Sexo	Cariótipo – International System for Human Cytogenetic (ISCN) 2014	Grupo de Trabalhadores
1	34/M	46,XY[15]	GP
2	29/M	46,XY[20]	GP
3	33/M	46,XY[11]	GP
4	48/M	46,XY[7]	GP
5	49/M	44,XY,-20,-21[8]/46,XY[2]	GP
6	43/M	46,XY,del(11)[20]	GP
7	43/M	46,XY,del(11)(q23)[4]/46,XY[16]	GP
8	34/M	46,XY,add(4)(?q35)[3]/46,XY[16]	GP
9	28/M	46,XY [10]	GP
10	62/M	32~45,XY,-1,-18,-7,-14,-16[cp9]	GP
11	36/M	46,XY[10]	GP
12	64/M	46,XY[5]	GP
13	60/M	46,XYdel(11)(q23)[3]/46,XY[17]	GP
14	27/M	46,XY[20]	GP
15	50/M	46,XY[10]	AF
16	49/M	46,XY[20]	AF
17	45/M	46,XY[10]	AF
18	61/M	20~30,+1,+14,+16,+18,+21,+22[5]/45,XY[5]	AF
19	54/M	46,XY[7]	AF
20	42/M	46,XY[20]	AF
21	46/M	18~35,XY,-4,-5,-8,-9,-11,-16,-17,-19,-20,-21,-22[8]/46,XY[2]	AF
22	57/M	46,XY[20]	AF
23	60/M	46,XY[25]	AE
24	43/M	46,XY(del5)[15]	AE
25	32/M	46,XY[15]	AE
26	59/M	46,XY [4]	AE
27	53/M	46,XY[20]	AE
28	56/M	46,XY[17]	AE
29	40/M	46,XY[7]	AE

Legenda: M: Masculino; GP: Grande Produtor; AF: Agricultura Familiar; AE: Agricultura Ecológica; del = deleção. [] significa o número de metáfases analisadas. Fonte: dados do estudo.

4.2.2 Análise de metilação dos genes de reparo de fita dupla em agricultores

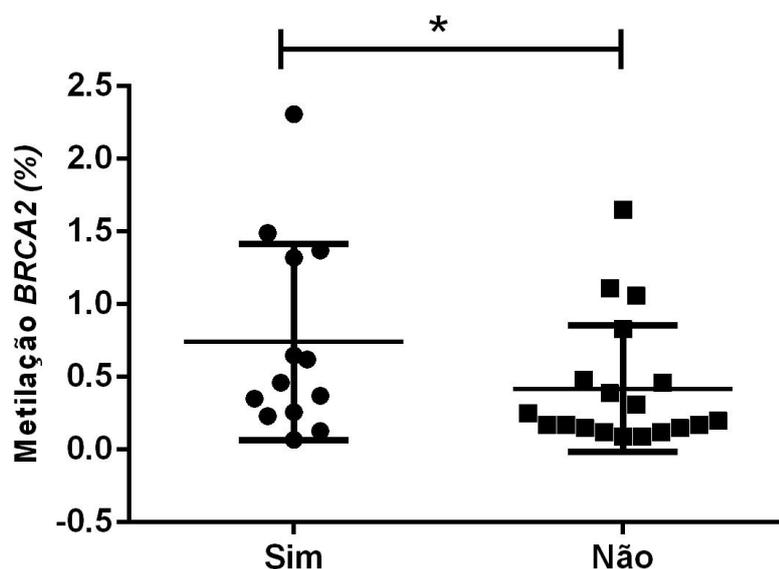
4.2.2.1 Variáveis

A análise de metilação em relação às variáveis dos agricultores não apresentou valores significativos para nenhum dos genes quando avaliou-se diferenças entre os grupos GP, AF e AE (Tabelas 16a e 16b). Não foi realizada análise para comparar os gêneros, visto que no universo amostral “agricultores” há apenas uma representante do sexo feminino, no grupo GP.

A variável cariótipo, que analisa as diferenças entre indivíduos com cariótipo normal ou alterado, também não apresentou valores significativos, assim como a análise de tempo de trabalho na agricultura, estratificado para menos ou mais de 12 anos, e a variável “tipo de contato”, que pode ser direto ou indireto.

A última variável analisada foi histórico familiar de câncer. Foram encontrados valores significantes para o gene *BRCA2* ($p=0,037$). A Figura 17 traz o gráfico de análise dessa variável, no qual observamos maiores valores de metilação entre os indivíduos expostos a agrotóxicos e com histórico conhecido de câncer na família.

Figura 17 - Gráfico da variável "histórico familiar de câncer" para o gene *BRCA2*



		Metilação <i>BRCA2</i>			
		Mediana (mínimo-máximo)	N	p	Desvio padrão
Histórico familiar de câncer	Sim	,4600 (,0700 - 2,3100)	13	0,037	0,6747
	Não	,1850 (,0000 - 1,1100)	19		0,4329

Fonte: Dados do estudo.

Tabela 16a- Análise de metilação em relação às variáveis, em agricultores, para os genes *ATM* e *BRCA2*

		Metilação <i>ATM</i>				Metilação <i>BRCA2</i>			
		Mediana (mínimo-máximo)	N	p	Desvio padrão	Mediana (mínimo-máximo)	N	p	Desvio padrão
Grupo	GP	,0000 (,0000 - 10,7100)	31	0,552	3,3656	,2300 (,0000 - 4,3800)	31	0,447	0,7986
	AF	,0000 (,0000 - 12,2800)	24		3,3317	,3600 (,0000 - 2,3100)	24		0,6154
	AE	,0000 (,0000 - 6,5900)	10		2,8921	,2900 (,0000 - 1,3700)	10		0,4468
Cariótipo	Normal	,0000 (,0000 - 6,8800)	19	0,658	2,7751	,2550 (,0600 - 1,6500)	20	0,153	0,4887
	Alterado	,0000 (,0000 - 5,9800)	8		2,1341	,2900 (,0000 - 1,1100)	9		0,3897
Tempo de trabalho com agrotóxicos	<12 anos	2,5850 (,0000 - 6,0900)	4	0,56	3,2721	,2700 (,0000 - 1,1100)	5	0,864	0,4308
	>12 anos	,0000 (,0000 - 12,2800)	42		3,1091	,2400 (,0000 - 2,3100)	41		0,5343
Tipo de contato	Direto	,0000 (,0000 - 12,2800)	24	0,846	3,6793	,1700 (,0600 - 1,4900)	23	0,832	0,4192
	Indireto	,0000 (,0000 - 6,2000)	14		2,5094	,2550 (,0000 - 1,6500)	16		0,508
Histórico familiar de câncer	Sim	,0000 (,0000 - 10,5200)	12	0,385	1,8675	,4600 (,0700 - 2,3100)	13	0,074	0,6747
	Não	,0000 (,0000 - 12,2800)	21		3,2631	,1850 (,0000 - 1,6500)	20		0,4329

Fonte: Dados do estudo.

Tabela 16b - Análise de metilação em relação às variáveis, em pacientes com SMD, para os genes *BRCA1*, *LIG4* e *RAD51*, cujas medianas foram zero.

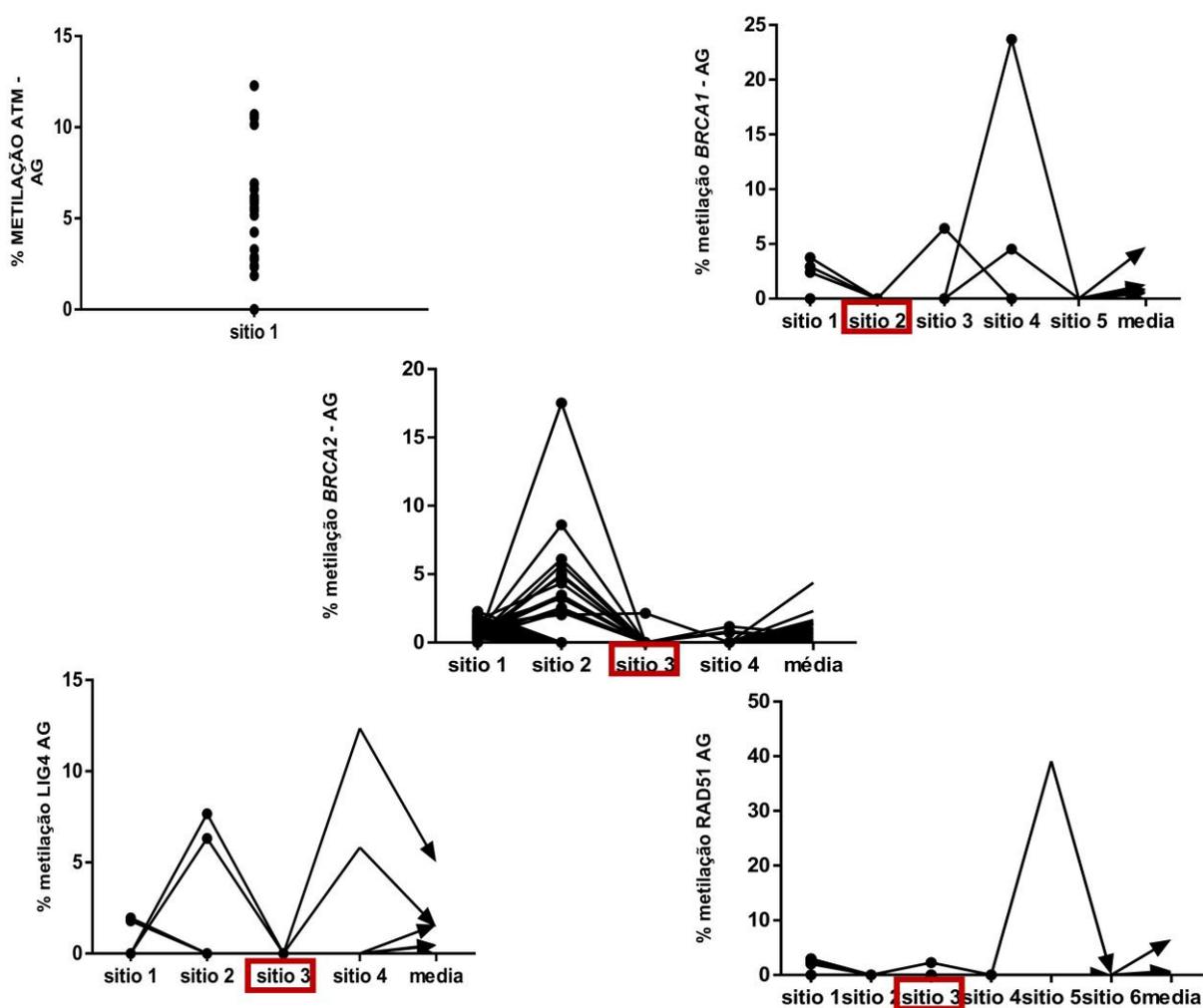
		Metilação <i>BRCA1</i>							Metilação <i>LIG4</i>							Metilação <i>RAD51</i>						
		Mediana (mínimo-máximo)	N	p	Desvio padrão	Mediana (mínimo-máximo)	N	p	Desvio padrão	Mediana (mínimo-máximo)	N	p	Desvio padrão	Mediana (mínimo-máximo)	N	p	Desvio padrão					
Grupo	GP	,0000 (,0000 - 1,2860)	30	0,268	0,2919	,0000 (,0000 - 1,4550)	30	0,483	0,2772	,0000 (,0000 - ,5600)	30	0,616	0,1345									
	AF	,0000 (,0000 - ,9080)	26		0,1781	,0000 (,0000 - 5,0075)	26		1,0172	,0000 (,0000 - 6,5200)	27		1,2576									
	AE	,0000 (,0000 - 4,7400)	9		1,58	,0000 (,0000 - ,0000)	10		,0000 (,0000 - ,0000)	8	0,616											
Cariótipo	Normal	,0000 (,0000 - 1,2860)	19	0,778	0,2951	,0000 (,0000 - ,0000)	20	0,66		,0000 (,0000 - 6,5200)	17	0,792	1,5752									
	Alterado	,0000 (,0000 - ,9080)	7		0,3431	,0000 (,0000 - 5,0075)	9		1,6691	,0000 (,0000 - ,3883)	9		0,1294									
Tempo de trabalho com agrotóxicos	<12 anos	,0000 (,0000 - ,9080)	4	0,612	0,454	,0000 (,0000 - 5,0075)	5	0,583	2,2394	,0000 (,0000 - ,5600)	5	0,725	0,2504									
	>12 anos	,0000 (,0000 - 1,2860)	42		0,2501	,0000 (,0000 - ,4875)	41		0,1023	,0000 (,0000 - 6,5200)	42		1,0111									
Tipo de contato	Direto	,0000 (,0000 - ,9080)	24	0,786	0,2058	,0000 (,0000 - 5,0075)	24	0,687	1,0223	,0000 (,0000 - ,7867)	25	0,897	0,1573									
	Indireto	,0000 (,0000 - 1,2860)	15		0,3549	,0000 (,0000 - ,0000)	14		,0000 (,0000 - ,5600)	14	0,1497											
Histórico familiar de câncer	Sim	,0000 (,0000 - ,7520)	12	0,985	0,2171	,0000 (,0000 - ,4875)	11	0,699	0,147	,0000 (,0000 - 6,5200)	13	0,147	1,7886									
	Não	,0000 (,0000 - ,5860)	20		0,165	,0000 (,0000 - ,0000)	20		,0000 (,0000 - ,0000)	20												

Fonte: Dados do estudo.

4.2.2.2 Padrão Gráfico de Metilação

Foi realizada uma análise gráfica para observação visual da variação entre os sítios investigados (Figura 18). O comportamento de variação foi heterogêneo em todos os genes, impossibilitando a formação de padrões bem definidos em que a maioria dos pacientes mostrou valores menores ou maiores em cada sítio. Porém, os *outliers* dos *hotspots* foram verificados e não apresentaram nenhuma característica clínica nitidamente influenciada pelo resultado da metilação.

Figura 18 - Visualização gráfica da variação de metilação nos sítios, entre os agricultores (em vermelho, os sítios *hotspots*)



Fonte: Dados do estudo.

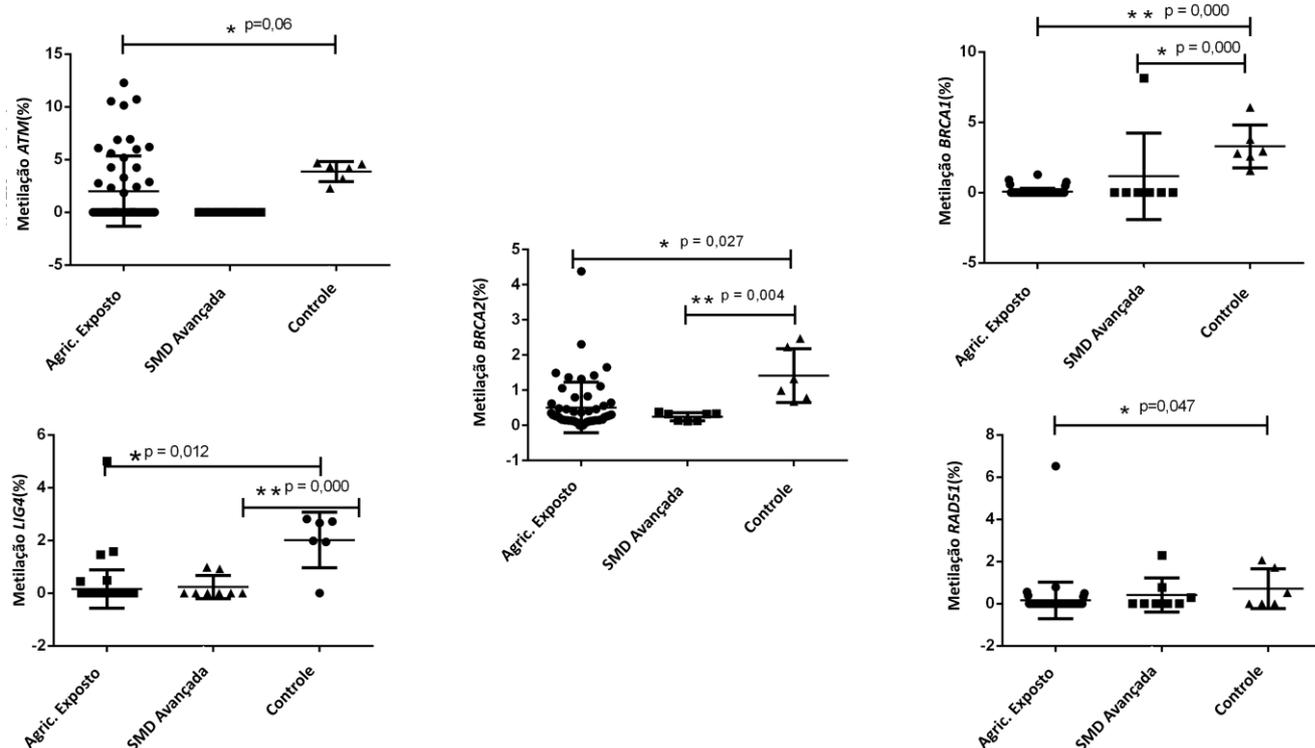
4.3 Análise comparativa de metilação entre controles, grupos de pacientes e de agricultores

A primeira análise visou comparar os níveis de metilação entre agricultores expostos a agrotóxicos (GP +AF), SMD formas avançadas (SMD-EB-1 + SMD-EB-2) e grupo controle. Foram obtidos valores significativos para todos os genes, com a metilação sempre sendo maior no grupo controle (Fig. 17): *ATM* ($p=0,037$; o p entre grupo controle e agricultores expostos foi de 0,000), *BRCA1* ($p=0,000$; houve diferença entre grupo exposto e controle, $p=0,000$, e entre SMD formas avançadas e controles, $p=0,000$); *BRCA2* ($p=0,006$; o p entre agricultores expostos e controle foi 0,027, e entre SMD formas avançadas e controle o p foi 0,004), *LIG4* ($p=0,009$; a diferença entre agricultores e controle deu-se com $p=0,000$, e entre SMD e controle, $p=0,012$) e *RAD51* ($p=0,009$; entre agricultores expostos e controles, $p=0,047$).

Na comparação dos níveis de metilação entre os grupos de agricultores não expostos (AE), SMD formas iniciais (SMD-SA-DU + SMD-SA-DM + SMD-DU + SMD-DM), e controle, obteve-se valores significativos para os genes *BRCA1* ($p=0,000$; entre agricultores e controles, $p=0,000$), *BRCA2* ($p=0,004$; entre SMD formas iniciais e controles, $p=0,004$ e entre agricultores e controles, $p=0,014$) e *LIG4* ($p=0,000$, tanto entre SMD e controles quanto entre agricultores e controles). Em todos esses resultados, a metilação apresentou-se maior nos controles (Fig. 18).

As análises comparando “SMD Formas Avançadas vs. SMD Formas Iniciais” e “Agricultores expostos vs. Agricultores não-expostos” não resultou em valores de p significativos. Todos os valores destas análises comparativas entre os grupos estão demonstrados na Tabela 17.

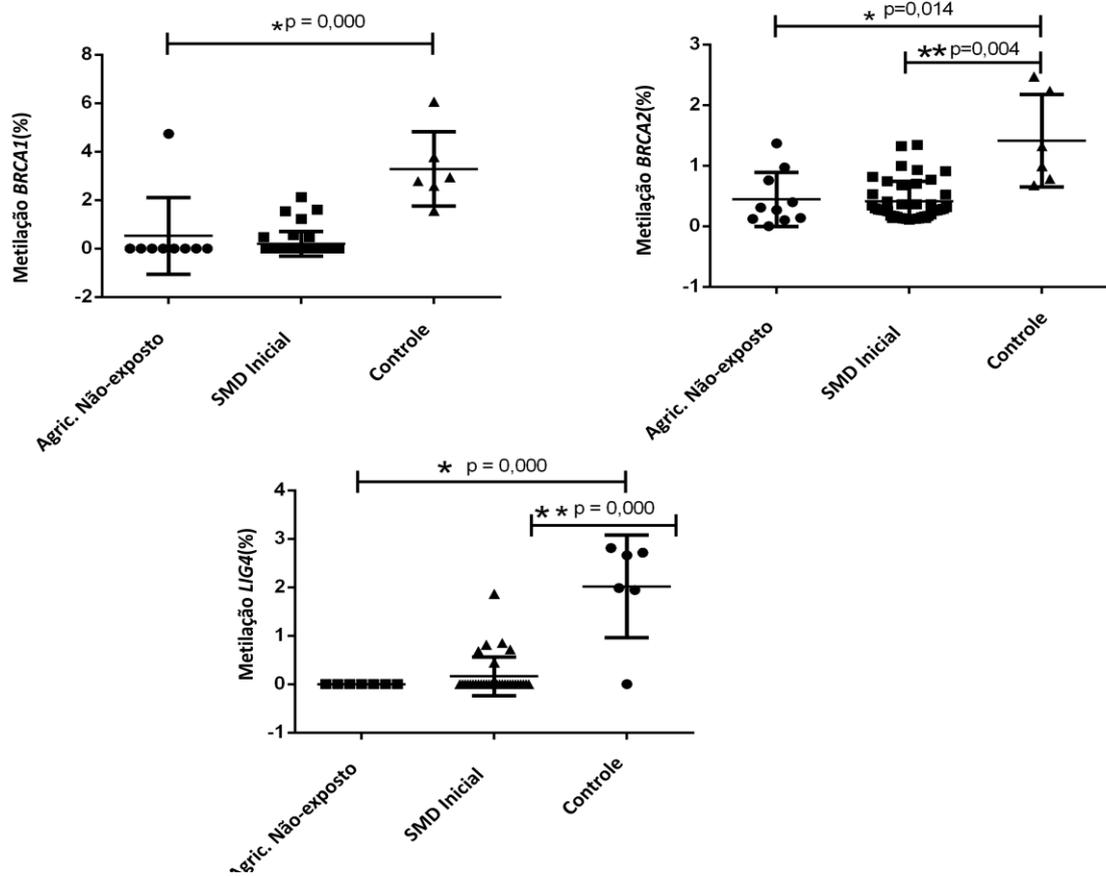
Figura 17 - Análise comparativa de metilação entre os grupos de agricultores expostos, SMD formas avançadas e controles.



	SMD Formas Avançadas	AG Exposto	Controle
Metilação ATM			
Mediana (mínimo-máximo)	,0000 (,0000 - 12,2800)	,0000 (,0000 - 4,9700)	4,2500 (2,2800 - 4,7000)
N	57	8	6
Desvio padrão	1,9949	3,3303	0,9485
p		0,037	
Metilação BRCA1			
Mediana (mínimo-máximo)	,0000 (,0000 - 8,1400)	,0000 (,0000 - 1,2860)	2,8690 (1,5660 - 6,0600)
N	58	8	6
Desvio padrão	0,246	3,3231	1,5328
p		0	
Metilação BRCA2			
Mediana (mínimo-máximo)	,2550 (,0600 - 1,6500)	,2287 (,1175 - ,3775)	1,1562 (,6775 - 2,4700)
N	57	8	6
Desvio padrão	0,1191	0,7212	0,7641
p		0,037	
Metilação LIG4			
Mediana (mínimo-máximo)	,0000 (,0000 - ,9800)	,0000 (,0000 - 5,0075)	,0000 (,0000 - 2,8100)
N	58	9	6
Desvio padrão	0,4651	0,7222	1,0589
p		0	
Metilação RAD51			
Mediana (mínimo-máximo)	,0000 (,0000 - 2,2866)	,0000 (,0000 - 6,5200)	,2633 (,0000 - 2,0733)
N	58	10	6
Desvio padrão	0,848	0,8712	0,9399
p		0,009	

Fonte: Dados do estudo.

Figura 18 - Análise comparativa de metilação entre os grupos de agricultores não-expostos, SMD de baixo risco e controles.



	SMD Formas Iniciais	AG Não-Exposto	Controle
Metilação ATM			
Mediana (mínimo-máximo)	2,9200 (,0000 - 10,1900)	,0000 (,0000 - 6,5900)	4,2500 (2,2800 - 4,7000)
N	46	10	6
Desvio padrão	2,6061	2,892	0,9485
p		0,184	
Metilação BRCA1			
Mediana (mínimo-máximo)	,0000 (,0000 - 2,1200)	,0000 (,0000 - 4,7400)	2,8690 (1,5660 - 6,0600)
N	41	9	6
Desvio padrão	0,5049	1,58	1,5329
p		0	
Metilação BRCA2			
Mediana (mínimo-máximo)	,2788 (,0000 - 1,3425)	,2900 (,0000 - 1,3700)	1,1562 (,6775 - 2,4700)
N	42	10	6
Desvio padrão	0,3315	0,4468	0,764
p		0,004	
Metilação LIG4			
Mediana (mínimo-máximo)	,0000 (,0000 - 1,8650)	,0000 (,0000 - ,0000)	,0000 (,0000 - 2,8100)
N	44	10	6
Desvio padrão	0,3538		1,059
p		0	
Metilação RAD51			
Mediana (mínimo-máximo)	,0000 (,0000 - 4,5167)	,0000 (,0000 - ,0000)	,2633 (,0000 - 2,0733)
N	46	8	6
Desvio padrão	0,7785		0,9399
p		0,067	

Legenda: As linhas horizontais nos gráficos representam as medianas gerais.

Fonte: Dados do estudo.

Tabela 17 - Valores das análises comparativas de metilação entre os grupos “SMD Formas Iniciais x SMD Formas Avançadas” e “Agricultor Exposto x Agricultor Não-Exposto”.

Metilação ATM	SMD Formas Iniciais	SMD Formas Avançadas	AG Exposto	AG Não Exposto
Mediana (mínimo-máximo)	2,9200 (,0000 - 10,1900)	3,1100 (,0000 - 4,9700)	,0000 (,0000 - 12,2800)	,0000 (,0000 - 6,5900)
N	46	7	55	10
Desvio padrão	2,5094	2,0563	3,3304	2,892
p		1		0,846
Metilação BRCA1				
Mediana (mínimo-máximo)	,0000 (,0000 - 2,1200)	,0000 (,0000 - 8,1400)	,0000 (,0000 - 1,2860)	,0000 (,0000 - 4,7400)
N	41	7	56	9
Desvio padrão	0,5049	3,0766	0,2461	1,58
p		1		0,762
Metilação BRCA2				
Mediana (mínimo-máximo)	,2788 (,0000 - 1,3425)	,3150 (,1175 - ,3775)	,2500 (,0000 - 4,3800)	,2900 (,0000 - 1,3700)
N	42	7	55	10
Desvio padrão	0,3315	0,1127	0,7212	0,4468
p		0,44		0,935
Metilação LIG4				
Mediana (mínimo-máximo)	,0000 (,0000 -1,8650)	,0000 (,0000 - ,9800)	,0000 (,0000 - 5,0075)	,0000 (,0000 - ,0000)
N	44	8	56	10
Desvio padrão	0,3538	0,4412	0,7222	
p		0,774		0,33
Metilação RAD51				
Mediana (mínimo-máximo)	,0000 (,0000 - 4,5167)	,0000 (,0000 - 2,2867)	,0000 (,0000 - 6,5200)	,0000 (,0000 - ,0000)
N	46	8	57	8
Desvio padrão	0,7785	0,8032	0,8712	
p		0,725		0,34

Fonte: Dados do estudo.

4.4 Análises de correlação

Avaliamos a influência do fenômeno de metilação sobre a expressão gênica com os testes de correlação de Spearman destas variáveis para os grupos:

- SMD formas iniciais: *ATM* ($p=0,468$), *BRCA1* ($p=0,506$), *BRCA2* ($p=0,299$), *LIG4* ($p=0,237$) e *RAD51* ($p=0,867$);
- SMD formas avançadas: *ATM* ($p=0,699$), *BRCA1* ($p=0,476$), *BRCA2* ($p=0,765$), *LIG4* (**$p=0,006$; $\rho=0,798$**) e *RAD51* ($p=0,851$);
- Agricultores expostos: *ATM* ($p=0,241$), *BRCA1* (**$p=0,046$; $\rho=0,34$**), *BRCA2* ($p=0,322$), *LIG4* ($p=0,560$) e *RAD51* ($p=0,926$);
- Agricultores não expostos: *ATM* ($p=0,940$), *BRCA1* (*), *BRCA2* ($p=0,798$), *LIG4* (*) e *RAD51* (*);

Todos os valores de ρ estão apresentados na Tabela 18; * significa a impossibilidade de calcular correlação devido a uma das variáveis ter valores constantes, ou seja, os valores de metilação eram todos 0,0000.

Como destacados na descrição acima e no gráfico abaixo, observa-se que houve correlação apenas para o gene *LIG4*, no grupo SMD formas avançadas, demonstrando uma relação positiva e forte; e no grupo de agricultores expostos foi demonstrada correlação positiva e fraca para o gene *BRCA1* (Figura 19).

Tabela 18, com valores de ρ na análise de correlação de Spearman, para as variáveis expressão gênica e metilação, em todos os genes.

		Metilação ATM (ρ)	Metilação BRCA1 (ρ)	Metilação BRCA2 (ρ)	Metilação LIG4 (ρ)	Metilação RAD51 (ρ)	p	N
SMD Formas Iniciais	Expressão ATM	0,11					0,468	46
	Expressão BRCA1		-0,107				0,506	41
	Expressão BRCA2			-0,164			0,299	42
	Expressão LIG4				0,182		0,237	44
	Expressão RAD51					0,025	0,867	46
SMD Formas Avançadas	Expressão ATM	-0,151					0,699	9
	Expressão BRCA1		-0,274				0,476	9
	Expressão BRCA2			0,117			0,765	9
	Expressão LIG4				0,798		0,006	10
	Expressão RAD51					-0,068	0,851	10
Agricultor Exposto	Expressão ATM	-0,198					0,241	37
	Expressão BRCA1		0,34				0,046	35
	Expressão BRCA2			0,173			0,322	35
	Expressão LIG4				0,102		0,56	35
	Expressão RAD51					-0,016	0,926	37
Agricultor Não Exposto	Expressão ATM	-0,3					0,94	9
	Expressão BRCA1		*				*	8
	Expressão BRCA2			-0,1			0,798	9
	Expressão LIG4				*		*	9
	Expressão RAD51					*	*	7

Fonte: Dados do estudo.

5 DISCUSSÃO

A metilação do DNA é um mecanismo epigenético de controle da expressão gênica sob crescente investigação nas mais diversas áreas da saúde humana. Este mecanismo está diretamente relacionado à regulação gênica, visto que a hipermetilação das ilhas CpG (regiões ricas em Citosina e Guanina) em regiões promotoras pode levar a silenciamento gênico ou redução da sua atividade. Conseqüentemente, pode ocorrer a inativação de genes que regulam as mais diversas vias de crescimento e divisão celular, como os genes de reparo do DNA, ciclo celular, aderência celular e apoptose, levando ao desenvolvimento de neoplasias (ESTELLER, 2002; LIYANAGE *et al.*, 2019).

Durante nossa avaliação, buscamos avaliar a metilação dos genes de reparo de fita dupla do DNA *ATM*, *BRCA1*, *BRCA2*, *LIG4* e *RAD51* em amostras de agricultores e de pacientes com síndrome mielodisplásica (SMD), buscando observar padrões de metilação que pudessem caracterizar uma situação de pré-doença (entre os diferentes níveis de exposição a agrotóxicos entre os agricultores) e doença (entre as formas iniciais e avançadas de SMD). Encontramos, em ambos os grupos, menores níveis de metilação desses genes quando comparado aos controles. A possível explicação para este fenômeno (menores níveis de metilação), tanto no grupo de pacientes quanto de agricultores, seria a existência de uma situação fisiológica que exige menor metilação, devido a um maior recrutamento dos genes de reparo para a correção de lesões no DNA tanto em SMD quanto em agricultores.

Resultados semelhantes foram encontrados por Li *et al.* (2017), e por Silva (2020), trabalhos nos quais foram avaliados os níveis de metilação de *MGMT* (*O⁶-Methylguanine - DNA Methyltransferase*) em trabalhadores expostos ao benzeno em indústrias petroquímicas e em postos de combustíveis, respectivamente. Em ambos os trabalhos, *MGMT* estava hipometilado nos trabalhadores, em relação aos controles, e Li J. *et al.* (2017) ainda encontraram uma associação negativa entre metilação e grau de dano ao DNA. O *MGMT* é um gene de reparo que codifica para uma proteína que remove especificamente lesões pró-mutagênicas do DNA na posição O⁶ da guanina (NAKAMURA *et al.*, 2001). Este gene apresenta-se hipermetilado e transcricionalmente silenciado em vários cânceres (glioma, linfomas e cólon, por exemplo); mas, interessante, em estudos com linhagens celulares, foram observadas variações nos padrões de metilação, encontrando tanto regiões

hipermetiladas quanto hipometiladas, com silenciamento em ambas as situações, indicando que outros fatores além da metilação são necessários para reprimir a atividade da região promotora (SOEJIMA *et al.*, 2005).

O silenciamento de *MGMT* por hipermetilação é um marcador de pior prognóstico em diversos cânceres, mas também um indicativo de boa resposta a terapia com agentes alquilantes, pois o efeito citotóxico desses agentes, necessário para atingir as células malignas, é diminuído quando há a presença de *MGMT* (JACINTO & ESTELLER, 2007). Benzeno é um agente alquilante (LI Q. *et al.* 2017), o que pode estar relacionado à redução da metilação dos trabalhadores expostos frente aos controles, já que a presença de um agente tóxico alquilante demanda maior atividade de reparo por *MGMT*, e para isso a metilação precisa ser reduzida.

Acreditamos que um dos resultados mais significativos encontrados em nossa pesquisa foi uma maior metilação do gene *ATM* em todos os cinco pacientes que evoluíram para leucemia mieloide aguda (LMA) (mediana dos que transformaram = 4,970; mediana dos que não transformaram = 2,455). Esse resultado parece bastante significativo se lembrarmos da função do gene *ATM* como sinalizador da lesão de dupla fita do DNA. Uma vez que ocorre o dano da dupla fita, *ATM* sinaliza para que haja parada do ciclo celular (*checkpoint*) e assim ocorra o recrutamento/ativação dos demais componentes das vias de reparo para que haja correção do dano ou apoptose. Caso *ATM* esteja com sua função diminuída ou totalmente bloqueada, há significativa chance dessa lesão levar a quebras cromossômicas, predispondo à instabilidade genômica e consequente desenvolvimento tumoral (SHEN *et al.*, 2005). Ou seja, alterações na função desse gene geram desestabilizações da proteína e estas estão associadas a maior incidência de leucemias e linfomas (BOULTWOOD, 2001).

Dentre os 5 (cinco) casos que apresentaram maior metilação do *ATM* e transformaram para LMA, dois achados chamam a atenção: 1) três pacientes apresentavam cariótipo normal (3/5); 2) apenas dois pacientes apresentavam aumento de blastos (2/5). Sabemos que os maiores preditores de transformação em LMA para um paciente com diagnóstico de SMD são a presença de um cariótipo alterado e o aumento do número de blastos. A ausência desses dois achados na maioria dos casos que transformaram em LMA, associada a uma maior metilação de *ATM*, reforça a importância do *ATM* na estabilidade genômica de SMD e nos pacientes aqui analisados.

Previamente, nosso grupo já havia encontrado associações de *ATM* com prognóstico em SMD. Foi verificado que o SNP rs228592 no gene *ATM* estava relacionado a menor razão de chances de desenvolver SMD de alto risco (RIBEIRO JR. *et al.*, 2013). A associação deste polimorfismo com SMD de baixo risco, sendo assim um fator protetivo, não estava relacionado aos achados de cariótipo, celularidade, gênero ou classificação da doença pela OMS. Dessa forma, assim como o polimorfismo rs228592 por si só foi associado a melhor prognóstico, nosso resultado de maior metilação deve ser melhor investigado como um preditor independente de risco de progressão para LMA, apesar das variáveis clínicas não serem indicativas desse desfecho. O impacto dessa maior metilação é semelhante ao de outras alterações genéticas associadas a casos graves de SMD ou LMA, por exemplo: alguns polimorfismos que provocam menor atividade da proteína *ATM* em pacientes com LMA propiciam a ocorrência de doença residual primária em pacientes tratados e impactam na sobrevida, diminuindo-a. Isto ocorre porque há uma deficiência na ligação e fosforilação de c-ABL por *ATM*, diminuindo a resposta pró-apoptótica mediante danos de fita dupla (SHI *et al.*, 2011).

Padrões aberrantes de metilação estão associados à progressão de SMD para LMA, como demonstrado por Jiang *et al.* (2009), que verificaram este fenômeno em todas as amostras de pacientes com SMD inicial afetando, em média, 95 de 1505 *loci* CpG e em pacientes após transformação de blastos (AREB e LMA) essa média foi de 179/1505, sugerindo que a metilação está envolvida com o processo de deleções cromossômicas, silenciamento de genes supressores tumorais, evolução clonal e transformação de SMD em LMA.

Na SMD, classicamente a hipermetilação global ou de alguns genes (por exemplo, *CDH1*, *ER- α* , *p15INK4B*, *p73*, *MEG3*, *SHP-1*, *FOXO3*, *DLC-1*, *SOCS1*, *CDKN2B*) está associada a uma pior evolução da doença e progressão para LMA (SHEN *et al.*, 2010; CECHOVA *et al.*, 2012; CALVO *et al.*, 2014; CHANDRA *et al.*, 2017; DENG *et al.*, 2017; FU *et al.*, 2017). O fenômeno da hipermetilação na SMD não parece ser global em todo o DNA ou em uma família completa de genes. Por exemplo, em um estudo prévio do nosso grupo avaliamos todo o perfil de metilação da família dos genes reguladores de transcrição de interferons, os IRF's (*IRF-1*, *IRF-2*, *IRF-3*, *IRF-4*, *IRF-5*, *IRF-6*, *IRF-7*, *IRF-8* e *IRF-9*) em SMD. Encontramos padrões diferenciados de metilação: os genes *IRF-3* e *IRF-5* estavam hipermetilados nos pacientes em relação aos controles; enquanto *IRF-2* e *IRF-7* não estavam metilados

nem em pacientes nem em controles; e pacientes com formas avançadas apresentavam metilação de *IRF-1*, *IRF-3*, *IRF-5*, *IRF-6* e *IRF-8* maiores que as dos pacientes com formas iniciais de SMD (SOUSA *et al.*, 2019). Esse dado demonstra que se os padrões de metilação variam tanto dentro de uma mesma família, podemos esperar padrões também diferenciados entre os genes de reparo, mesmo que façam parte de uma mesma via, e ainda mais por atuarem formando complexos.

Diante do padrão geral encontrado de baixa metilação em relação aos controles, entendemos que a hipometilação de proto-oncogenes pode levar à ativação de genes relacionados a um pior prognóstico e menor sobrevida em SMD. Isto ocorre, por exemplo, com o gene *CD93*, que codifica uma proteína receptora transmembrana envolvida na patogênese também de câncer colorretal e glioblastoma (OLSEN *et al.*, 2015; LANGENKAMP *et al.*, 2015); Reilly *et al.* (2019) encontraram um padrão de hipometilação para este gene em pacientes com SMD de alto risco e uma correlação negativa entre metilação e expressão, apesar do papel desse gene em neoplasias mielóides ainda ser desconhecido.

A hipometilação também foi observada em pacientes com SMD por Zhang *et al.* (2017) no gene *DNMT3A*, que codifica uma metiltransferase que age na metilação *de novo*; neste estudo, a maioria dos pacientes de alto risco estavam hipometilados e a sobrevida destes foi significativamente menor que a dos não-hipometilados (11 meses vs. 36 meses). Neste trabalho não foi avaliada correlação, mas é citado que *DNMT3A* encontra-se hiperexpresso em neoplasias hematológicas, o que sugere uma correlação negativa metilação/expressão gênica.

Outro exemplo de hipometilação em SMD foi a relatada por Wu *et al.* (2016) para o gene *LET-7A-3*, no qual pacientes de baixo risco com hipometilação tiveram sobrevida média de 9 meses, enquanto a observada para os sem hipometilação foi de 33 meses. Este gene codifica o microRNA let-7a-3, cuja hiperexpressão está associada a pior prognóstico em LMA, resultando em menor sobrevida mesmo entre pacientes que alcançam remissão morfológica completa (LI *et al.*, 2013).

Não podemos descartar que os nossos resultados de hipometilação sejam reflexos diretos dos sítios escolhidos para a avaliação. O desenho dos *primers* foi baseado em regiões com maiores correlações entre metilação e expressão, no entanto, estes foram provenientes de dados disponíveis para LMA, pois inexistiam dados semelhantes para SMD. Apesar das semelhanças nos cursos clínicos e abordagens terapêuticas, SMD não pode ser considerada uma doença “pré-

leucêmica”, devendo ser respeitadas as diferenças fisiopatológicas de ambas as doenças, e estas possivelmente impactaram nos resultados que obtivemos para SMD com dados que só tinham sido experimentados em LMA.

Esteller (2002) sugere a existência de diferentes graus de metilação para cada gene, e que isso também pode variar entre os diferentes tumores. Dessa forma, seria possível cânceres em que nenhuma das ilhas CpG do gene estariam metiladas, enquanto em outros cânceres algumas destas ilhas do mesmo gene estariam hipermetiladas. Assim, encontrar resultados de hipometilação em sítios específicos, tanto em SMD quanto nos agricultores, ainda que considerados *hotspots*, não exclui a possibilidade de haver outros sítios nos mesmos genes que estejam diferencialmente hipermetilados. Isto sugere apenas que estes pontos ainda não foram avaliados quanto aos seus níveis de metilação e o impacto biológico deles, pois seria radical esperar um fenótipo tumoral que hipermetile todas as ilhas CpG.

Em nossas análises, investigamos a ocorrência de correlação entre os níveis de metilação e de expressão gênica, tanto no grupo de pacientes quanto no de agricultores. Seguindo a lógica válida para os casos de hipermetilação, de que a metilação dificultaria a expressão dos genes ao impedir a ligação dos fatores de transcrição, as correlações esperadas entre metilação e expressão seriam, portanto, negativas. O resultado, no entanto, nos chamou a atenção, que foi a ausência de correlação entre hipometilação e maior expressão de cada gene avaliado do sistema de reparo de dupla fita de DNA. Acreditamos que possa haver duas possíveis explicações iniciais para isso: 1) há fatores de transcrição (FT) capazes de reconhecer a metilação e, dessa forma, os genes são expressos normalmente: são fatores de transcrição com ausência de um domínio de ligação metil-CpG (chamados de proteínas ligantes de DNA metilado ou leitores de metilação de DNA), assim, existem FT's que reconhecem sequências com ou sem metilação (ZHU *et al.*, 2016; HUGHES & LAMBERT, 2017); 2) além disso, Cerne *et al.* (2012) observaram discrepâncias entre valores de metilação encontrados para *BRCA1* em diversos estudos sobre câncer de mama; além da já discutida existência de vários sítios possíveis, que explicaria a variação dos níveis observados, estes autores apontam a possibilidade de infiltrações de células saudáveis circundantes durante a coleta, influenciando assim os resultados obtidos, tanto de níveis de metilação quanto da sua relação com a expressão. Se isso ocorre em tumores sólidos, faz ainda mais sentido para a coleta de tumores hematológicos.

No trabalho de Souza *et al.* (2019), as relações encontradas entre metilação e expressão não foram exclusivamente negativas: apesar dos *IRFs* 1, 3, 5, 6 e 8 terem se apresentado hipermetilados, os *IRFs* 1, 3 e 6 estavam também mais expressos; e o *IRF-5*, apesar de hipermetilado e menos expresso, estava mais expresso nos pacientes com SMD que evoluíram para LMA do que nos que não evoluíram.

Nesse mesmo sentido, Reilly *et al.* (2019) observaram correlação positiva entre hipermetilação e expressão aumentada de *WT1* num grupo de 200 pacientes com LMA. O gene *WT1* é frequentemente hiperexpresso por blastos em pacientes com malignidades hematológicas, sendo a presença de seu RNA mensageiro no sangue periférico um marcador de doença residual em LMA e SMD, e o antígeno *WT1* um promissor alvo para imunoterapia (SUGIYAMA, 2010; TAWARA *et al.*, 2017).

Nesse contexto, Xu *et al.* (2019) fizeram interessantes observações acerca de correlações entre metilação e expressão. Neste estudo, eles investigaram o impacto da metilação na expressão gênica local e distante; sendo a “local” caracterizada como uma expressão regulada pela metilação do promotor daquele gene, e a “distante” uma expressão regulada pela metilação do promotor de outros genes. Na correlação da expressão local, 88% dos genes analisados apresentaram correlação negativa. Na análise de correlação da expressão distante, observou-se que para genes hipometilados, a correlação tendia a ser positiva, e para genes hipermetilados, a tendência era de correlações negativas. Este resultado corrobora nossos achados de correlação positiva forte para *LIG4* em formas avançadas de SMD, hipometilado e com redução da expressão nos casos de pior prognóstico. Xu e colaboradores (2019) também observaram que 2% dos genes analisados exibiam correlação tanto positiva quanto negativa, ações contrárias, mas que são possíveis graças à existência de diversas CpG's nas regiões promotoras de um mesmo gene.

Dessa forma, nossos dois únicos resultados significativos de correlação metilação/expressão, sendo elas positivas e forte para o gene *LIG4* no grupo “SMD Formas Avançadas” e fraca para o gene *BRCA1* no grupo “Agricultores Expostos”) podem sugerir que, especificamente nos sítios CpG's da sequência escolhida, estes genes podem estar sob a ação dessa regulação distante. As proteínas de reparo atuam mediante formação de complexos com funções complementares e diferentes condições para a regulação dessas funções, sendo necessário um equilíbrio estrito dos componentes críticos para que a cascata de reparo aos danos no DNA seja bem

sucedida (JACHIMOWICZ *et al.*, 2019), ou seja, alterações em um gene podem afetar outros genes, ainda que a atuação deles não seja direta.

Diante disto, os níveis de metilação e sua correlação com a expressão dos genes avaliados precisam ser melhor investigados por meio de análises em larga escala que permita a avaliação de uma grande região de dinucleotídeos CpG dentro de uma região promotora. Ainda investigar os demais mecanismos relacionados com a regulação da expressão genica em todos os genes que participam destes complexos poderia, possivelmente, mostrar cenários mais amplos e capazes de explicar os baixos níveis de expressão mesmo em genes hipometilados, pois outros fatores tais como a citada regulação distante, mutações ou outras alterações epigenéticas em outros pontos da cascata podem ser responsáveis pelos resultados observados. Há ainda um outro ponto a ser considerado, levantado no estudo de Koch *et al.* (2018), que é a existência de inúmeros *hotspots* estabelecidos com base em dados de metilação, mas que pouquíssimos deles apresentam potencial para serem considerados como biomarcadores, pois apenas alguns são de fato relevantes na prática clínica (examinaram 14.743 publicações de biomarcadores de câncer baseados em metilação, 1.800 foram relacionados a prognósticos e somente 14 têm efetivo impacto translacional).

Um exemplo da interferência de outros fatores é a conhecida hipermetilação da região promotora do gene *CDKN2A* em vários tipos de cânceres, um padrão que também foi observada por Zhu *et al.* (2001), em câncer de pulmão, enquanto nenhuma metilação foi encontrada na região promotora do gene *CDKN2D*. Um tratamento das células com 5-aza-2'-desoxicitidina (5-Aza-CdR) aumentou a expressão dos produtos de ambos os genes, independente do status de metilação; no entanto, um tratamento de altas doses de 5-Aza-CdR com depsipeptídio, um inibidor de histona-desacetilase, diminuiu a expressão de p16INK4a, produto do *CDKN2A*, e suprimiu o crescimento celular, mas induziu ainda mais a expressão de p16INK4d, produto do *CDKN2D*, demonstrando que a regulação da expressão gênica depende de outros mecanismos além da metilação, e que a metilação dos fatores de transcrição que se ligam na região promotora do *CDKN2D* também merecem investigação para melhor entendimento dos resultados observados.

Dos genes avaliados em nosso estudo, o *BRCA1* e *BRCA2*, importantes responsáveis pela manutenção da integridade cromossômica, são fortes candidatos à uma regulação exercida pela interação com outros genes. As proteínas BRCA1/2

são conhecidas por serem “*hub proteins*”, ou seja, elas atuam como ponto de ligação com várias moléculas, o que também é chamado de interatividade promíscua, o que leva à geração de inúmeros complexos com funções biológicas distintas que podem ou não ser relevantes para a supressão tumoral (VENKITARAMAN, 2014). Estes genes, hipometilados neste estudo, também se mostraram hipoexpressos em pacientes com SMD hipocelular (RIBEIRO JR. *et al.*, 2017a), *BRCA1* apresentou menor expressão em pacientes de SMD com menor sobrevida (RIBEIRO JR. *et al.*, 2017b) e *BRCA2* estava hipoexpresso em agricultores expostos a pesticidas com anormalidades cromossômicas (COSTA *et al.*, 2021). Tais trabalhos utilizaram amostras de indivíduos em comum com as utilizadas nesta tese.

Em estudo realizado pelo nosso grupo, Ribeiro Jr. *et al.* (2017a) avaliaram a correlação entre a expressão do gene *LIG4* e a de genes que fazem parte de diferentes mecanismos de reparo (NER (reparo por excisão de nucleotídeos), HR e NHEJ) e relatou uma característica interessante deste gene, que foi a sua correlação positiva com outros que pertencem a vias que não a sua – NER E HR. Este achado, somado ao nosso, que mostra resultados significativos de hipometilação do *LIG4* em todas as comparações de grupos (SMD Formas Iniciais, SMD Formas Avançadas, Agricultor Exposto e Agricultor Não-Exposto) em relação aos controles sugere, além de uma colaboração íntima tanto entre os mecanismos de reparo de fita dupla quanto entre estes e o mecanismo de reparo de fita simples (RIBEIRO JR. *et al.*, 2017a), também uma atividade intensa dessa via de reparo. Como esse mecanismo não exige um molde intacto do DNA para executar o reparo, é possível que ele esteja performando as tentativas iniciais e mais imediatas de correção dos danos; mas, apesar de ser um mecanismo eficiente, também é altamente mutagênico (JACHIMOWICZ *et al.*, 2019), o que explicaria a relação desse gene com os casos de pior prognóstico/maior risco.

Outro ponto é que as células tronco hematopoéticas tendem a realizar mais reparo do que apoptose, e para isso utilizam mais NHEJ do que HR (ao contrário de células progenitoras, que preferencialmente realizam mais apoptose e utilizam mais a via HR) (ZHOU *et al.*, 2013), o que também pode justificar uma menor metilação de *LIG4* para que ele fique mais disponível para responder às demandas.

Nas comparações dos níveis de metilação entre os grupos de agricultores expostos, não-expostos e controles, verificamos uma diminuição significativa da metilação de todos os genes no grupo de agricultores expostos. Nesse contexto,

especificamente sobre o *ATM*, uma função crucial deste gene é o controle de danos provocados por espécies reativas de oxigênio (ERO's). Essas são capazes de diminuir a vida útil das células tronco hematopoéticas (CTH), que perdem sua capacidade de auto renovação (ITO *et al.*, 2004; ITO *et al.*, 2006). O aumento das ERO's mediante exposição a pesticidas leva a danos ao DNA e maior liberação de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β , IL-6, NF-kB e COX-2 (SHAH *et al.*, 2020). Podemos especular que nossos resultados sugerem uma maior atuação do *ATM* no contexto da exposição, estimulada possivelmente pela presença dos agrotóxicos.

Com relação aos agricultores não-expostos, estes apresentaram uma menor metilação significativa em relação aos controles nos mesmos genes que o grupo de formas avançadas de SMD (*BRCA1*, *BRCA2* e *LIG4*). Este resultado possivelmente indica que ainda que não haja exposição ocupacional a pesticidas há pelo menos 12 anos, os danos consequentes dessa exposição demandam uma necessidade de reparo semelhante à que é requerida no organismo de pacientes com doença avançada. Se as modificações epigenéticas através de metilação causadas por agrotóxicos podem ser inclusive herdadas, é compreensível que seus efeitos permaneçam no indivíduo por toda a vida, mesmo sem exposição direta (THORSON *et al.*, 2020). Outro ponto a se considerar é que, além da exposição ocupacional progressiva, há também uma exposição ambiental, já que, devido à sua natureza química extremamente lipofílica e sem cargas (portanto, pouco reativos e difíceis de excretar), os agrotóxicos apresentam uma alta capacidade de permanecer no ambiente e de bioacumulação (LUSHCHAK *et al.*, 2018). Os pesticidas estão no ar devido à evaporação, são depositados no solo após chuvas, aderem a partículas de areia, são absorvidos pelos lençóis freáticos, escoam para corpos d'água, além da própria absorção pelas plantações, poluindo, assim, todo o território vizinho (DAMALAS & ELEFTHEROHORINOS, 2011).

A exposição ambiental é caracterizada justamente quando os agroquímicos afetam pessoas que moram próximas a áreas cultivadas. No território de Limoeiro do Norte, de onde são provenientes as amostras de agricultores incluídas nesse estudo, foi detectado que o lençol freático possui forte contaminação, devido à extensa área destinada ao agronegócio, que demanda uma grande quantidade de agrotóxicos. Cerca de 198 destes produtos foram inventariados e aproximadamente 48% deles eram classificados como extremamente ou altamente tóxicos (GAMA *et al.*, 2013).

Os autores destacaram, ainda, que 39,5% dos compostos investigados podem ser encontrados no solo e 28,6% nos recursos hídricos superficiais e subterrâneos, demandando a necessidade de frequente monitoramento ambiental e dos impactos dessa poluição.

De forma geral, envolvendo tanto exposição ocupacional quanto ambiental, foram encontradas relações entre a densidade das plantações e maior incidência de LLA (COSTE *et al.*, 2020); exposição ocupacional dos pais a poeira orgânica com maior risco de LMA infantil (PATEL *et al.*, 2020); bifenilos policlorados associados a LNH (KLIL-DRORI *et al.*, 2018). O aumento do risco para leucemias agudas infantis foi associado a exposição ocupacional paterna a pesticidas durante o período perinatal, a uso materno pré-natal de inseticidas/rodenticidas e a indivíduos que vivem <100 m de campos tratados com pesticidas (BAILEY *et al.*, 2014; BAILEY *et al.*, 2015; GUNIER *et al.*, 2017; FERRI *et al.*, 2018). Um aumento do risco de leucemia entre crianças que residem perto de áreas cultiváveis também foi observado por Malagoli *et al.* (2016). E Rau *et al.* (2012) encontraram níveis aumentados de Endosulfan na medula óssea de crianças com malignidade hematológica em comparação com aquelas sem, e todas elas eram de áreas expostas a pesticidas.

Falando especificamente de SMD, a metanálise de Jin *et al.* (2014) investigou especificamente a associação da exposição a pesticidas com o desenvolvimento de síndrome mielodisplásica, a partir de 1942 casos e 5359 controles, indicando uma associação entre a exposição a inseticidas e um aumento estatisticamente significativo do risco de SMD. O estudo de caso-controle de Kokouva *et al.* (2011) também associou a exposição a inseticidas, herbicidas e fungicidas a casos de câncer linfohematopoiético, SMD e leucemia, observando um padrão de dose-resposta e forte associação principalmente ao fumar ou se alimentar durante a aplicação. Fumar ou comer são hábitos comuns entre agricultores, como mostra o estudo de Buralli *et al.* (2020), que mostrou que estes trabalhadores, principalmente os da agricultura familiar, geralmente sofrem altas exposições por não terem suporte técnico adequado, utilizarem inadequadamente os EPI's (ou não usarem) e apresentarem comportamentos de risco, como comer e beber nas plantações e tomar banho apenas ao final do dia.

Trabalhadores agrícolas, comprovadamente, apresentam mais danos ao DNA identificados em ensaios cometa, testes de micronúcleos e de tamanho de telômeros,

cada vez mais evidenciando a genotoxicidade desses compostos e a influência da exposição ocupacional, além da ambiental e dietária (PINTO *et al.*, 2020).

Estes fatos reforçam a dificuldade de se determinar tanto os efeitos da exposição a longo prazo quanto os níveis seguros de exposição, pois elaborar estudos acurados acerca desta problemática esbarra em questões metodológicas e logísticas para identificar e quantificar os níveis de exposição. Isso porque é comum que os sujeitos da pesquisa sequer lembrem os nomes dos produtos aos quais foram expostos nem saibam especificar frequência, duração e intervalos da exposição (MARYAM *et al.*, 2015).

Considerando que os pesticidas são capazes de afetar o corpo de forma multissistêmica e que os efeitos dependem de dose, tempo e duração da exposição, o ideal é que esta seja reduzida ao máximo possível (SARWAR, 2016).

A atividade agrícola, historicamente, é marcada por precarização devido a longas e exaustivas jornadas, informalidade, baixa escolaridade e condições inadequadas de trabalho. Sabidamente, o contexto socioeconômico e ambiental de uma população influencia as chances de desenvolvimento de neoplasias, assim como em seus desfechos; e esse quadro assume especial importância quando o assunto é agricultura, pois tem-se a vulnerabilidade social somando-se a episódios frequentes de exposição química com potencial carcinogênico (WUNSCH FILHO *et al.*, 2008; RIBEIRO & NARDOCCI, 2013).

Boccolini e colaboradores, em seu estudo de 2017, no qual investigaram a associação entre agricultores brasileiros e risco de linfoma non-Hodgkin (LNH), demonstraram que trabalhadores agrícolas na faixa etária de 20 a 39 anos, idades semelhantes às médias do nosso estudo, tiveram uma chance 31% maior de morrer de LNH em comparação com trabalhadores não agrícolas na mesma faixa etária, assim como maior risco de morte por LNH entre trabalhadores agrícolas analfabetos em comparação com trabalhadores não agrícolas no mesmo nível educacional. Nesse mesmo sentido, Maryam *et al.* (2015) demonstraram que ser agricultor indicava um risco significativamente maior de desenvolver leucemia aguda em comparação com outros empregos, especialmente para os filhos, que também sofriam os efeitos da exposição dos pais. Esses dados reforçam a importância de se observarem os impactos biológicos das condições socioeconômicas da população.

Portanto, a exposição aos agrotóxicos tem estreita relação com o surgimento de cânceres hematológicos, sendo extensa a literatura evidenciando associações de

maior risco de desenvolvimento de leucemias, linfomas, mieloma múltiplo e doenças mieloproliferativas mediante exposição ocupacional a compostos como terbufos, deltametrina, pentaclorofenol, carbaril, captan, mecrocop, captafol, radon, paraquat e glifosato (KACHURI *et al.*, 2013; ZHENG *et al.*, 2015; PRESUTTI *et al.*, 2016; BOCCOLINI *et al.*, 2017; FERRI *et al.*, 2017; GUNIER *et al.*, 2017; LAMURE *et al.*, 2019; LEON *et al.*, 2019; TUAL *et al.*, 2019).

Dentre os casos de agricultores avaliados em nossa pesquisa, também presentes no estudo de Costa *et al.* (2021) encontramos exposição a fungicidas (Folicur 200CE®, Tecto SC® e Orius 250 EC®) e herbicidas (Gramoxone 200® e Roundup® - este é composto por glifosato e fosfometil), sendo a marca que contém glifosato a mais reportada. O Glifosato é um dos defensivos agrícolas mais utilizados mundialmente, e esta é também a realidade no Brasil, onde seu uso corresponde a cerca de 62% dentre os herbicidas e a 35% de todos os pesticidas (DIAS *et al.* 2020). Os autores avaliam o impacto do uso desta substância nos nascimentos em regiões vizinhas a áreas de plantio de soja transgênica, detectando um aumento de 5% da mortalidade infantil (503 mortes a mais por ano) nas regiões que recebem águas afetadas por esse pesticida, ainda que distantes das áreas de uso, o que reforça a preocupação que se deve ter com a exposição ambiental.

A falta de significância quando comparamos os níveis de metilação entre os grupos “Agricultor Exposto (n=59) x Agricultor Não-Exposto (n=10)” e também “SMD Formas Iniciais (n=46) x SMD Formas Avançadas (n=10)” pode ser atribuída à diferença do tamanho amostral entre esses grupos e também a um grande número de metilações iguais a zero, o que tira a normalidade da análise. Análises com maiores e mais equiparados números de indivíduos poderiam trazer uma comparação mais robusta. Outro ponto relevante para a falta de significância é justamente a escolha dos sítios para análise: além dos *hotspots* utilizados estarem descritos para LMA, não para SMD, enquanto para o *ATM* avaliamos um único sítio, para *BRCA2* e *LIG4* avaliamos a média de quatro, para *BRCA1* avaliamos a média de cinco e para *RAD51* foi a média de seis. A análise de um *hotspot* que seja mais específico para SMD poderia fornecer resultados mais relevantes.

Observamos no nosso estudo, valores reduzidos e semelhantes de metilação tanto no grupo de pacientes quanto no de agricultores, diferindo apenas quando estes eram comparados aos controles, que apresentaram maior metilação em todas as análises. Tal semelhança de metilação entre os grupos “doença” e “pré- doença”

ganha entendimento ao considerarmos que: a) a SMD pode ser reflexo de um envelhecimento natural do sistema hematopoético, o que reduz a capacidade da maquinaria de reparo do DNA; b) mutações em genes de reparo levam a um envelhecimento precoce do tecido hematopoético (ZHOU *et al.*, 2013); e c) a exposição a agrotóxicos, além de provocar um desequilíbrio da atividade das metiltransferases (LIN *et al.*, 2010), pode induzir a um envelhecimento precoce das células hematopoéticas, seja pelo encurtamento dos telômeros (ANDREOTTI *et al.*, 2015), ou como efeito de estresse oxidativo pelas ERO's, que levam a quebras de fita simples/dupla, mutações e variadas alterações epigenéticas (SESTI *et al.* 2012).

A significativa hipometilação dos grupos de comparação em relação aos controles foi um resultado surpreendente no nosso estudo. Esperava-se que nos controles a metilação fosse menor, como uma forma de regulação epigenética de prontidão, sempre ativada para corrigir os inúmeros danos que sofremos diariamente. Nesse cenário, uma perda dessa pronta capacidade, provocada por qualquer aumento da metilação (que poderia ser causada pela exposição a pesticidas, entre outros fatores), seria a responsável por permitir o desenvolvimento das neoplasias. No entanto, observamos o contrário, metilação nos controles maior que nos estados de “pré-doença” (exposição) e doença.

Observa-se que alguns pesticidas, especialmente os organofosforados como malathion e parathion, são agentes alquilantes (BHINDER & CHAUNDHRY, 2013). De forma semelhante ao *MGMT*, citado anteriormente, o gene *ATM* também está relacionado à resistência terapêutica com alquilantes e sua ativação é influenciada pela presença desses agentes citotóxicos (ADAMSON *et al.*, 2002; CARROZZA *et al.*, 2009; AGNIHOTRI *et al.*, 2014). O mecanismo de ação de quimioterapia com drogas alquilantes baseia-se na lesão O⁶-alquilguanina provocada no DNA por essas substâncias; esta lesão é convertida em quebra de fita dupla e estimula a apoptose das células cancerígenas (QUIROS *et al.* 2011).

Pacientes com perda de função de *BRCA1/2* apresentam maior sensibilidade a tratamentos com estes agentes (ZÁMBORSZKY *et al.*, 2017; DE TALHOUET *et al.*, 2020; MACIEL *et al.*, 2020). Kurosawa *et al.* (2020) observaram que na deficiência de POL β , o mecanismo de reparo NHEJ, por meio do *LIG4*, atua como uma via alternativa no reparo de danos provocados por agentes alquilantes. Outros estudos como os de Toma *et al.* (2018) e Gupta *et al.* (2019) verificaram que uma maior expressão de *LIG4* foi associada à perda de sensibilidade ao tratamento com

temozolomida, um alquilante, em pacientes com glioblastoma.

A inibição de *BRCA2* e *RAD51* mostrou-se uma estratégia eficiente para sensibilizar células de glioma à terapia com agentes alquilantes, sendo inclusive sugerida uma tripla abordagem com inibição de PARP, de HR e depleção de *MGMT* para otimizar a eficácia de temozolomida nesses pacientes (QUIROS *et al.* 2011). A expressão aumentada de *RAD51* também está relacionada a resistência a alquilantes como cisplatina e mostarda nitrogenada (GACHECHILADZE *et al.*, 2017). Assim, fica clara a íntima relação de genes de reparo e resposta a agentes alquilantes, podendo essa demanda ser a responsável pela hipometilação nos agricultores. A falta de diferença significativa quando se comparou os grupos de trabalhadores expostos com não expostos pode ser um indicativo de que até níveis mais baixos de exposição (somente ambiental, no caso dos não-expostos, frente à ambiental mais ocupacional dos expostos) já podem ser suficientes para ativar o mecanismo de reparo, tanto HR quanto NHEJ.

No caso da hipometilação que observamos no grupo dos pacientes em relação aos controles - nos genes *BRCA2* e *LIG4* (SMD formas iniciais) e *BRCA1*, *BRCA2* e *LIG4* (SMD formas avançadas) - não é possível neste trabalho avaliar se na doença esse fenômeno é uma causa ou consequência da SMD. Ou seja, temos pelo menos dois cenários possíveis, um em que a doença se desenvolve, mesmo havendo ativação adequada da via, porque os danos decorrentes da SMD estão ocorrendo numa taxa tão elevada que algumas células neoplásicas escapam do reparo e se proliferam. Nesse contexto, seria uma consequência da doença. Assim, outros fatores envolvidos na patogênese da doença podem estar contribuindo para uma redução da eficiência do processo de reparo, apesar de ele ainda ser eficaz.

No outro cenário, uma maior ativação do mecanismo NHEJ, além da necessária, estaria levando à geração de erros, e isso pode ser sugerido visto que *LIG4*, envolvido na via de reparo mais mutagênica, aparece hipometilado nos dois grupos de pacientes. A maior atividade desse gene poderia estar relacionada à geração de clones que escapam do processo de apoptose e, assim, a ativação de *BRCA1* e *BRCA2* seria naturalmente aumentada para tentar conter essa proliferação. Nesse contexto, a hipometilação, principalmente de *LIG4*, poderia ser uma causa da doença.

Um achado também interessante da análise de metilação entre os agricultores foi a maior metilação do *BRCA2* entre os trabalhadores que tinham

histórico familiar de câncer, quando comparado aos que não tinham. O silenciamento deste gene por hipermetilação pode representar uma maior susceptibilidade ao desenvolvimento de neoplasias, visto a essencial função deste gene em relação a controle do ciclo celular, recombinação e reparo do DNA. Famílias que carregam mutações no gene *BRCA2* apresentam maior risco de desenvolvimento de câncer antes dos 65 anos (VENKITARAMAN, 2002; ASPEREN *et al.*, 2005; PILARSKI, 2019).

Os resultados deste trabalho não têm impacto translacional imediato, mas trazem contribuições interessantes sobre genes de reparo de fita dupla em SMD e o impacto provocado neles a partir da exposição a pesticidas, podendo servir como base para posteriores estudos com maior número de participantes, seja com os mesmos genes ou com outros que atuam na mesma via, formando complexos. Tem-se conhecimento também que outros modificadores epigenéticos como RNAs longos não-codificantes (lncRNA's) e miRNA's encontram-se desregulados em blastos e no microambiente da medula óssea de pacientes com SMD, indicando a necessidade de se explorar múltiplas vias (BOND *et al.*, 2020).

Dentro do universo da metilação, de uma forma mais ampla, outros genes envolvidos no processo também merecem ser investigados, tais como os fatores de remodelação da cromatina e histonas demetilases/desacetilases, por exemplo. Assim como uma análise da desmetilação (5hmC), para verificar o equilíbrio entre a maquinaria metilação/desmetilação, poderia também agregar resultados interessantes à linha de pesquisa que seguimos neste trabalho, reduzindo assim as limitações nas quais esbarramos e aumentando as chances de serem encontrados biomarcadores capazes de predizer prognóstico e resposta a tratamentos.

6 CONCLUSÕES

Os genes de reparo de fita dupla avaliados nesse estudo, tanto em pacientes com SMD quanto nos agricultores, apresentaram um perfil de hipometilação em relação aos controles, com uma hipermetilação relativa do gene *ATM* reafirmando a importância deste perfil clássico de metilação para um pior prognóstico de SMD e *BRCA2* mais metilado nos trabalhadores com histórico familiar de câncer também ratificando a participação deste gene no contexto de predisposição genética a essa condição, principalmente em um cenário de exposição ocupacional ou ambiental a agrotóxicos.

Foi demonstrado que uma exposição ocupacional pregressa, somada a uma exposição ambiental, é capaz de estimular alterações no perfil de metilação dos agricultores semelhantes às observadas em pacientes com formas avançadas de SMD; e a hipometilação geral observada, uma possível resposta a danos causados por agentes alquilantes presentes nos agrotóxicos, indica a necessidade de rigidez na vigilância sanitária em relação à liberação, determinação de níveis seguros e condições de uso desses compostos.

Assim, concluímos que níveis adequados de metilação dos genes de reparo de fita dupla avaliados neste trabalho são importantes para a tentativa de manutenção de estabilidade genética tanto na síndrome mielodisplásica quanto mediante exposição a pesticidas, um fator reconhecido de susceptibilidade ao desenvolvimento desta doença.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMSON, A.W. ATM is activated in response to N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced DNA alkylation. **J Biol Chem**, 277(41):38222-9, 2002. doi: 10.1074/jbc.M204409200.
- AGNIHOTRI, S. *et al.* ATM regulates 3-methylpurine-DNA glycosylase and promotes therapeutic resistance to alkylating agents. **Cancer Discov.**, 4(10):1198-213., 2014 doi: 10.1158/2159-8290.CD-14-0157
- ALBITAR, M. *et al.* Myelodysplastic syndrome is not merely “preleukemia”. **Clinical Trials and Observations**, 100(3):791-798 (2002).
- ANDREOTTI, G. *et al.* Pesticide Use and Relative Leukocyte Telomere Length in the Agricultural Health Study. **PLoS ONE** 10(7): e0133382, 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133382>
- ANVISA. Nota Técnica Nº 23/2018. Nota Técnica Preliminar sobre as conclusões da reavaliação do Glifosato com as respectivas recomendações e proposta de minuta de RDC. Disponível em <
<http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117833/Nota+t%C3%A9cnica+23+de+2018+-+Glifosato/faac89d6-d8b6-4d8c-8460-90889819aaf7>> Acesso em 08 de setembro de 2020.
- ARBER, D.A. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. **Blood** 127:2391-2405, 2016.
- ASPEREN, C.J. *et al.* Cancer risks in BRCA2 families: estimates for sites other than breast and ovary. **Journal of Medical Genetics**; 42:711-719, 2005.
- ASSIS, J. *et al.* Ovarian cancer and DNA repair: DNA ligase IV as a potential key. **World J Clin Oncol.** 4(1): 14–24, 2013.
- BAILEY, H.D. *et al.* Parental occupational pesticide exposure and the risk of childhood leukemia in the offspring: findings from the childhood leukemia international consortium. **International journal of cancer** 135(9):2157-2172, 2014. doi:10.1002/ijc.28854
- BAILEY, H.D. *et al.* Home pesticide exposures and risk of childhood leukemia: Findings from the childhood leukemia international consortium. **International journal of cancer** vol. 137,11: 2644-63, 2015. doi:10.1002/ijc.29631
- BEGAM, N. *et al.* Promoter Hypermethylation of the ATM Gene as a Novel Biomarker for Breast Cancer. **Asian Pac J Cancer Prev.** 18(11): 3003–3009 (2017). doi: 10.22034/APJCP.2017.18.11.3003.
- BELLI, C.B. *et al.*, Myelodysplastic syndromes in South America: A multinational study of 1080 patients. **American Journal Of Hematology**, v. 90, n. 10, p.851-858, 2015.
- BENETATOS, L. & VARTHOLOMATOS, G. Enhancer DNA methylation in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. **Cell Mol Life Sci**, 75(11):1999-2009, 2018. doi: 10.1007/s00018-018-2783-2
- BHINDER, P. & CHAUNDHRY, A. Mutagenicity Assessment of Organophosphates using Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism Assay. **Toxicol Int.**, 20(3): 254–260, 2013. doi: 10.4103/0971-6580.121678
- BOCCOLINI, P.M.M. *et al.* Pesticide use and non-Hodgkin's lymphoma mortality in

- Brazil. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v.216, Issue 4, p.461-466, 2013.
- BOCCOLINI, P.M.M. *et al.* Non-Hodgkin lymphoma among Brazilian agricultural workers: A death certificate case-control study. **Archives of environmental & occupational health** v. 72,3: 139-144, 2016.
- BOND, D.R. *et al.* Unravelling the Epigenome of Myelodysplastic Syndrome: Diagnosis, Prognosis, and Response to Therapy. **Cancers (Basel)**, 12(11): 3128, 2020. doi: 10.3390/cancers12113128
- BORTOLHEIRO, T.C. Classificações morfológicas das síndromes mielodisplásicas: da classificação Franco-Americana-Britânica (FAB) à classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS). **Rev. bras. hematol. hemoter.** 28(3):194-197, 2006.
- BOND, D.R. *et al.* Unravelling the Epigenome of Myelodysplastic Syndrome: Diagnosis, Prognosis, and Response to Therapy. **Cancers**, 12, 3128, 2020). doi:10.3390/cancers12113128
- BOULTWOOD, J. Ataxia telangiectasia gene mutations in leukaemia and lymphoma. **J Clin Pathol.**, 54(7):512-6, 2001. doi: 10.1136/jcp.54.7.512.
- BRASIL. Lei Nº 7802, de 11 de julho de 1989. DOU de 12.7.1989.
- BURALLI, R.J. *et al.* Occupational exposure to pesticides and health symptoms among family farmers in Brazil. **Rev. Saúde Pública** vol.54, 2020. <https://doi.org/10.11606/s1518-8787.2020054002263>
- BURKE, C.; HAYDE, J.; WALSHE, J. *et al.* A review of therapy-related myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukaemia (t-MDS/AML) in Irish patients: a single centre experience. **Hematology**, 22:6, 341-346 (2017).
- CALVO, X. *et al.* High levels of global DNA methylation are an independent adverse prognostic factor in a series of 90 patients with de novo myelodysplastic syndrome. **Leuk Res.**, 38(8):874-81. doi: 10.1016/j.leukres.2014.04.015.
- CARROZZA, M.J. *et al.* PARP inhibition during alkylation-induced genotoxic stress signals a cell cycle checkpoint response mediated by ATM. **DNA Repair**, 8, 1264–1272, 2009. doi:10.1016/j.dnarep.2009.07.010
- CATENACCI, D.V., SCHILLER, G.J. Myelodysplastic syndromes: a comprehensive review. **Blood Rev.** 19(6):301-319, 2005.
- CAVALCANTE, G.M. Tissue methylation and demethylation influence translesion synthesis DNA polymerases (TLS) contributing to the genesis of chromosomal abnormalities in myelodysplastic syndrome. **J Clin Pathol** 2020; 0:1–9. doi:10.1136/jclinpath-2020-207131
- CECHOVA, H. *et al.* Monitoring of methylation changes in 9p21 region in patients with myelodysplastic syndromes and acute myeloid leucemia. **Neoplasma**, 59(2):168-74, 2012. doi: 10.4149/neo_2012_022.
- CERNE, J.Z. *et al.* BRCA1 promoter methylation status does not predict response to tamoxifen in sporadic breast cancer patients. **Breast Cancer Res. Treat.** 135, 135–143, 2012.
- CHANDRA, D. *et al.* Utility of 5-Methylcytosine Immunohistochemical Staining to Assess Global DNA Methylation and Its Prognostic Impact in MDS Patients. **Asian Pac J Cancer Prev.**18(12): 3307–3313, 2017. doi: 10.22034/APJCP.2017.18.12.3307

- CHAUFFAILLE, M.L.L.F. Alterações cromossômicas em síndrome mielodisplásica. **Rev. bras. hematol. hemoter** 28(3):182-187, 2006a.
- CHAUFFAILLE, M.L.L.F. Alterações moleculares em síndrome mielodisplásica. **Rev. bras. hematol. hemoter** 28(3):188-193, 2006b.
- COGLE, C.R. Incidence and Burden of the Myelodysplastic Syndromes. **Curr Hematol Malig Rep** 10:272–281, 2015.
- COLLOTTA, M. *et al.* Epigenetics and pesticides. **Toxicology** vol. 307, p.35-41, 2013.
- CORONADO-POSADA, N. & OLIVERO-VERBEL, J. In silico evaluation of pesticides as potential modulators of human DNA methyltransferases. **SAR QSAR Environ Res**, 30(12):865-878, 2019. doi: 10.1080/1062936X.2019.1666165
- COSTA, M.B *et al.* Chromosomal abnormalities and dysregulated DNA repair gene expression in farmers exposed to pesticides. **Environmental Toxicology and Pharmacology** 82, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2020.103564>
- COSTA, V.I.B. *et al.* Environmental and occupational exposure to pesticides and the non-Hodgkin lymphoma. **Saúde debate** vol.41 no.112, 2017.
- COSTE, A. *et al.* Agricultural crop density in the municipalities of France and incidence of childhood leukemia: An ecological study. **Environmental research**, 187, 109517, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109517>
- CREMONA, C.A. & BEHRENS, A. Atm signaling and cancer. **Oncogene** v. 33, pages 3351–3360, 2014.
- CURL, C. *et al.* Synthetic Pesticides and Health in Vulnerable Populations: Agricultural Workers. **Current environmental health reports** vol. 7,1: 13-29, 2020. doi:10.1007/s40572-020-00266-5
- DAMALAS, C.A. & ELEFTHEROHORINOS, I.G. Pesticide Exposure, Safety Issues, and Risk Assessment Indicators. **Int J Environ Res Public Health**. 8(5): 1402–1419, 2011. doi: 10.3390/ijerph8051402
- DANCEY, Christine & REIDY, John. **Estatística Sem Matemática para Psicologia: Usando SPSS para Windows**. Porto Alegre, Artmed, 2006.
- DE TALHOUET, S. *et al.* Clinical outcome of breast cancer in carriers of BRCA1 and BRCA2 mutations according to molecular subtypes. **Scientific Reports** 10, 7073, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63759-1>
- DEJEUX, E. *et al.* Identification and quantification of differentially methylated loci by the pyrosequencing technology. **Methods in Molecular Biology**, Clifton, v. 507, p. 189-205, 2009.
- DENG, C-Y. *et al.* Clinical Value of p15, DAPK, SOCS1 and FHIT Genes Combined Detection in the Early Diagnosis and Prognosis Evaluation of Myelodysplastic Syndrome. **Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi**, 25(6):1751-1755, 2017. doi: 10.7534/j.issn.1009-2137.2017.06.031.
- DESAUNIERS, D. *et al.* Effects of Mixtures of Polychlorinated Biphenyls, Methylmercury, and Organochlorine Pesticides on Hepatic DNA Methylation in Prepubertal Female Sprague-Dawley Rats. **International Journal of Toxicology**, 28(4):294-307, 2009. doi:10.1177/1091581809337918
- DIAS, M. *et al.* Glyphosate Use in Agriculture and Birth Outcomes of Surrounding Populations. **IZA Discussion Papers**, 12164, 2019.

DIEESE. O mercado de trabalho assalariado rural brasileiro. **Estudos e Pesquisas**, n.74, 2014.

DOLATSHAD, H. *et al.* Disruption of SF3B1 results in deregulated expression and splicing of key genes and pathways in myelodysplastic syndrome hematopoietic stem and progenitor cells. **Leukemia** 29:1092-1103, 2015.

DONOVAN, P.J.O e LIVINGSTON, D.M. BRCA1 and BRCA2: breast/ovarian cancer susceptibility gene products and participants in DNA double-strand repair. **Carcinogenesis** 31 n.6:961-967 (2010).

ECONOMOPOULOU, C. *et al.* Analysis of apoptosis regulatory gene expression in the bone marrow (BM) of adult de novo myelodysplastic syndromes (MDS). **Leuk Res** 32(1):61-69 (2008).

ESTELLER, M. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. **Oncogene** vol. 21, 5427–5440, 2002.

FERRI, G.M. *et al.* Maternal Exposure to Pesticides, Paternal Occupation in the Army/Police Force, and CYP2D6*4 Polymorphism in the Etiology of Childhood Acute Leukemia. **Journal of pediatric hematology/oncology** v. 40,4: e207-e214, 2018. doi:10.1097/MPH.0000000000001105

FOULKES, W.D. & SHUEN, A.Y. In Brief: BRCA1 and BRCA2. Foulkes, W. D., & Shuen, A. Y. In Brief: BRCA1 and BRCA2. **The Journal of Pathology**, 230(4), 347–349 (2013). doi:10.1002/path.4205

FU, H.Y. Clinical significance of hypermethylation of DLC-1 gene in myelodysplastic syndrome patients and effects of decitabine on DLC-1 gene expression. **Zhonghua Yi Xue Za Zhi**, 14;97(6):412-417, 2017. doi: 10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2017.06.003.

FUH, K. *et al.* Homologous recombination deficiency real-time clinical assays, ready or not? **Gynecologic Oncology**, Volume 159, Issue 3, Pages 877-886 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2020.08.035>.

GAMA, A.F. *et al.* Inventário de agrotóxicos e risco de contaminação química dos recursos hídricos no semiárido cearense. **Quim. Nova**, v. 36, n. 3, 462-467, 2013.

GACHECHILADZE, M. *et al.* RAD51 as a potential surrogate marker for DNA repair capacity in solid malignancies. **Int. J. Cancer**, 141, 1286–1294, 2017.

GAHLON, H.L. *et al.* Influence of DNA Lesions on Polymerase-Mediated DNA Replication at Single-Molecule Resolution. **Chem. Res. Toxicol.** 30:1972–1983 (2017).

GREENBERG, P.L. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. **Blood**, 120(12):2454-65 (2012). doi: 10.1182/blood-2012-03-420489.

GU, Y. *et al.* Association of the ATM gene polymorphisms with papillary thyroid cancer. **Endocrine** v. 45, pages 454–461 (2014).

GUARINI, A. *et al.* ATM gene alterations in chronic lymphocytic leukemia patients induce a distinct gene expression profile and predict disease progression. **Haematologica**, Vol. 97 No. 1 (2012). <https://doi.org/10.3324/haematol.2011.049270>

GUMY-PAUSE, F. *et al.* ATM gene and lymphoid malignancies. **Leukemia** v. 18, pages 238–242 (2004).

- GUPTA, G. *et al.* Myelodysplastic syndromes/neoplasms: recent classification system based on World Health Organization Classification of Tumors – international Agency for Research on Cancer for Hematopoietic and Lymphoid Tissues. **Journal of Blood Medicine**, 1:171–182 (2010).
- GUPTA, S.K. *et al.* PARP Inhibitors for Sensitization of Alkylation Chemotherapy in Glioblastoma: Impact of Blood-Brain Barrier and Molecular Heterogeneity. **Front. Oncol.**, v.8, 2019. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00670>
- GUNIER, R.B. *et al.* A task-based assessment of parental occupational exposure to pesticides and childhood acute lymphoblastic leukemia. **Environmental research** vol. 156:57-62, 2017. doi:10.1016/j.envres.2017.03.001
- HASTINGS, R.J. *et al.* Guidelines for cytogenetic investigations in tumours. **European Journal of Human Genetics** 24:6–13 (2016).
- HE, Y.Z. *et al.* Association between RAD51 gene polymorphism (-135G/C) and susceptibility of myelodysplastic syndrome and acute leukemia: evidence based on a meta-analysis. **Tumor Biology** volume 35, pages615–621(2014).
- HELLSTRÖM-LINDBERG, E. & MALCOVATI, L. Supportive care, growth factors, and new therapies in myelodysplastic syndromes. **Blood Reviews** 22:75-91 (2008).
- HONG, M. & HE, G. The 2016 Revision to the World Health Organization Classification of Myelodysplastic Syndromes. **J Transl Int Med.** 5(3): 139–143 (2017).
- HOEIJMAKERS, J.H.J. DNA Damage, Aging, and Cancer. **N Engl J Med**, 361:1475-85, 2009.
- HUGHES, T.R. & LAMBERT, S.A. Transcription factors read epigenetics. **Science**, vol. 356, Issue 6337, p. 489-490, 2017. doi: 10.1126/science.aan2927
- HWANG, S.M. *et al.* Short telomere length and its correlation with gene mutations in myelodysplastic syndrome. **J Hematol Oncol**, 9, 62 (2016). <https://doi.org/10.1186/s13045-016-0287-9>
- IARC. **Monographs on the identification of carcinogenic hazards to humans.** Disponível em: < <https://monographs.iarc.fr/agents-classified-by-the-iarc/> > Acesso em 08 de setembro de 2020.
- INCA. **Exposição no trabalho e ambiente – Agrotóxicos.** Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/exposicao-no-trabalho-e-no-ambiente/agrotoxicos>> 2019. Acesso em 07 de setembro de 2020.
- ISSA, J.P. Epigenetic Changes in the Myelodysplastic Syndrome. **Hematol Oncol Clin North Am.** 24(2): 317–330 (2010). doi: 10.1016/j.hoc.2010.02.007
- JHANWAR, S.C. Genetic and epigenetic pathways in myelodysplastic syndromes: a brief overview. **Advances in biological regulation** 58:28-37 (2015).
- ITO, K. *et al.* Regulation of oxidative stress by ATM is required for self-renewal of haematopoietic stem cells. **Nature**, 21;431(7011):997-1002, 2004. doi: 10.1038/nature02989
- ITO, K. *et al.* Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells. **Nature Medicine**, 12(4):446-51, 2006. doi: 10.1038/nm1388
- JACINTO, F.V & ESTELLER, M. MGMT hypermethylation: a prognostic foe, a predictive friend. **DNA Repair (Amst)**, 1;6(8):1155-60, 2007. doi:

10.1016/j.dnarep.2007.03.013

JACHIMOWICZ, R.D. *et al.* DNA double-strand break repair pathway choice - from basic biology to clinical exploitation. **Cell Cycle**, 18(13):1423-1434, 2019. doi: 10.1080/15384101.2019.1618542

JACOBS, A. Oncogenes in the myelodysplastic syndrome. **Blood Reviews**, vol.3, Issue 2, p.105-109, 1989.

JHANWAR, S.C. Genetic and epigenetic pathways in myelodysplastic syndromes: A brief overview. **Adv Biol Regul.**, 58:28-37 (2015). doi: 10.1016/j.jbior.2014.11.002.

JIANG, Y. *et al.* Aberrant DNA methylation is a dominant mechanism in MDS progression to AML. **Blood**, 113(6): 1315–1325, 2009. doi: 10.1182/blood-2008-06-163246

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** 9(10): e110850, 2014.

JUNEJO, N.N e AIKHATEEB, S.S. BRCA2 gene mutation and prostate cancer risk: Comprehensive review and update. **Saudi Medical Journal** v. 41(1), 2020.

KACHURI, L. *et al.* Multiple pesticide exposures and the risk of multiple myeloma in Canadian men. **International journal of cancer** vol. 133,8: 1846-58, 2013. doi:10.1002/ijc.28191

KANG, M. *et al.* The prognostic impact of mutations in spliceosomal genes for myelodysplastic syndrome patients without ring sideroblasts. **BMC Cancer** 15:484, 2015.

KHAN, H. *et al.* Role of DNA methylation in the pathogenesis and treatment of myelodysplastic syndromes. **Semin Hematol.** 50(1):16-37, 2013. doi: 10.1053/j.seminhematol.2013.01.001.

KIM, H.S. *et al.* Mutation at Intronic Repeats of the Ataxia-Telangiectasia Mutated (ATM) Gene and ATM Protein Loss in Primary Gastric Cancer with Microsatellite Instability. **PLoS ONE** 8(12): e82769, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082769>

KLIL-DRORI, A.J. *et al.* Serum organochlorines and non-Hodgkin lymphoma: A case-control study in Israeli Jews and Palestinians. **Chemosphere** vol. 213 : 395-402, 2018. doi:10.1016/j.chemosphere.2018.09.069

KOCH, A. *et al.* Analysis of DNA methylation in cancer: Location revisited. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 15, n. 7, p. 459–466, 2018.

KOKOUVA, M. *et al.* Pesticide exposure and lymphohaematopoietic cancers: a case-control study in an agricultural region (Larissa, Thessaly, Greece). **BMC public health** vol. 11 5, 2011.

KUROSAWA, A. *et al.* Complex genetic interactions between DNA polymerase β and the NHEJ ligase. **The FEBS Journal**, 287:377–385, 2020.

LAMURE, S. *et al.* Association of Occupational Pesticide Exposure With Immunochemotherapy Response and Survival Among Patients With Diffuse Large B-Cell Lymphoma. **JAMA network open** vol. 2,4 e192093, 2019. doi:10.1001/jamanetworkopen.2019.2093

LANDAU-OSSONDO, M. *et al.* Why pesticides could be a common cause of prostate and breast cancers in the French Caribbean Island, Martinique. An overview on key

mechanisms of pesticide-induced cancer. **Biomedicine & Pharmacotherapy** Volume 63, Issue 6, Pages 383-395, 2009.

LANGENKAMP, E. *et al.* Elevated expression of the C-type lectin CD93 in the glioblastoma vasculature regulates cytoskeletal rearrangements that enhance vessel function and reduce host survival. **Cancer Res**, 1;75(21):4504-16, 2015. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-3636

LAURINI, E. *et al.* Role of Rad51 and DNA repair in cancer: A molecular perspective. **Pharmacology & Therapeutics**, vol. 208, 2020. doi:10.1016/j.pharmthera.2020.107492

LEON, M.E. *et al.* Pesticide use and risk of non-Hodgkin lymphoid malignancies in agricultural cohorts from France, Norway and the USA: a pooled analysis from the AGRICOH consortium. **International journal of epidemiology** vol. 48,5:1519-1535, 2019. doi:10.1093/ije/dyz017

LI, J. *et al.* MGMT hypomethylation is associated with DNA damage in workers exposed to low-dose benzene. **Biomarkers**, v. 22, n. 5, p. 470-475, 2017.

LI, Q. *et al.* Relationship between MGMT gene expression and treatment effectiveness and prognosis in glioma. **Oncol Lett** 14: 229-233, 2017. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.6123>

LI, Y. *et al.* Overexpressed let-7a-3 is associated with poor outcome in acute myeloid leukemia. **Leuk Res.**, 37(12):1642-7, 2013. doi: 10.1016/j.leukres.2013.09.022

LIN *et al.* The tobacco-specific carcinogen NNK induces DNA methyltransferase 1 accumulation and tumor suppressor gene hypermethylation in mice and lung cancer patients. **J. Clin. Invest.**, 120, pp. 521-532, 2010.

LIYANAGE, C. *et al.* Promoter Hypermethylation of Tumor-Suppressor Genes p16INK4a, RASSF1A, TIMP3, and PCQAP/MED15 in Salivary DNA as a Quadruple Biomarker Panel for Early Detection of Oral and Oropharyngeal Cancers. **Biomolecules**, 9(4): 148, 2019. doi: 10.3390/biom9040148

LUSHCKAK, V.I. *et al.* Pesticide toxicity: a mechanistic approach. **EXCLI Journal**, 17:1101-1136, 2018. <http://dx.doi.org/10.17179/excli2018-1710>

MACHADO-NETO, J.A. *et al.* Screening for hotspot mutations in PI3K, JAK2, FLT3 and NPM1 in patients with myelodysplastic syndromes. **Clinical Sciences**, 66 (5), 2011. <https://doi.org/10.1590/S1807-59322011000500014>

MACIEL, S.F.V.O. *et al.* FANCD2 and BRCA1 have differential expression among the FA-BRCA genes in primary breast cancer. **Braz. J. Hea. Rev.**, v. 3, n. 4, p.7910-7927, 2020. doi:10.34119/bjhrv3n4-056

MAGALHÃES, S.M.M. Síndromes mielodisplásticas – diagnóstico de exclusão. **Rev. bras. hematol. hemoter.** 28(3):175-177, 2006.

MAGALHÃES, S. M. M. *et al.* Epidemiological and clinicopathological data from the brazilian registry of patients with myelodysplastic syndromes and comparative analysis between different geographic areas. **53rd ASH Annual Meeting and Exposition**, 2010.

MALAGOLI, C. *et al.* Passive exposure to agricultural pesticides and risk of childhood leukemia in an Italian community. **International journal of hygiene and environmental health** vol. 219,8: 742-748, 2016. doi:10.1016/j.ijheh.2016.09.015

- MARYAM, Z. *et al.* Relationship between exposure to pesticides and occurrence of acute leukemia in Iran. **Asian Pacific journal of cancer prevention**, vol. 16,1: 239-44, 2015. doi:10.7314/apjcp.2015.16.1.239
- MORAES, A.C.R. *et al.* Síndromes mielodisplásicas: aspectos moleculares, laboratoriais e a classificação OMS 2008. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** 31(6):463-470, 2009.
- NAKAMURA, M. *et al.* Promoter methylation of the DNA repair gene MGMT in astrocytomas is frequently associated with G:C → A:T mutations of the TP53 tumor suppressor gene. **Carcinogenesis**, v. 22, Issue 10, p1715–1719, 2001. <https://doi.org/10.1093/carcin/22.10.1715>
- NAVARRETE-MENESES, M.P. & PÉREZ-VERA, P. Pyrethroid pesticide exposure and hematological cancer: epidemiological, biological and molecular evidence. **Reviews on Environmental Health**, 0(0), 2019. doi:10.1515/reveh-2018-0070.
- NATELSON, E.A. Benzene-induced acute myeloid leukemia: a clinician's perspective. **Am J Hematol.** 82(9):826-830, 2007.
- NEUBAUER, A. *et al.* Mutations of the ras Proto-Oncogenes in Childhood Monosomy 7. **Blood**, vol.77, n.3, p. 594-59, 1991.
- NISHIKAWA, T., MIYAHARA, E., HORIUCHI, M., *et al.* Benzene metabolite 1,2,4-benzenetriol induces halogenated DNA and tyrosines representing halogenative stress in the HL-60 human myeloid cell line. **Environmental health perspectives** 120(1):62-67, 2012.
- OLSEN, R.S. *et al.* CD93 gene polymorphism is associated with disseminated colorectal cancer. **Int J Colorectal Dis.**, 30(7): 883–890, 2015. doi: 10.1007/s00384-015-2247-1
- PADUA, R.A. & WEST, RR. Oncogene mutation and prognosis in the myelodysplastic syndromes. **British Journal of Haematology**, 111, 873±874, 2000.
- PANNUNZIO, N.R. *et al.* Nonhomologous DNA end-joining for repair of DNA double-strand breaks. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 293, Issue 27, 6, p.10512-10523, 2018. <https://doi.org/10.1074/jbc.TM117.000374>
- PATEL, D.M. *et al.* Parental occupational exposure to pesticides, animals and organic dust and risk of childhood leukemia and central nervous system tumors: Findings from the International Childhood Cancer Cohort Consortium (I4C). **International journal of cancer** vol. 146,4 : 943-952, 2020. doi:10.1002/ijc.32388
- PEDROSO, D. C. C. *et al.* Telomere length and telomerase activity in immature oocytes and cumulus cells of women with Polycystic Ovary Syndrome. **Reproductive Sciences**, v. 1, p. 1-10, 2020.
- PELLAGATTI, A. & BOULTWOOD, J. The molecular pathogenesis of the myelodysplastic syndromes. **European Journal of Haematology** 95:3-15, 2015.
- PILARSKI, R. The Role of BRCA Testing in Hereditary Pancreatic and Prostate Cancer Families. **American Society of Clinical Oncology Educational**, Book 39, 79-86, 2019. doi: 10.1200/EDBK_238977
- PINHEIRO, R.F. & CHAUFFAILLE, M.L.L.F. Síndrome mielodisplásica secundária à quimio ou radioterapia – SMD relacionada a tratamento. **Rev. bras. hematol. hemoter** 28(3):201-203, 2006.

- PINTO, B.G.S. *et al.* Occupational exposure to pesticides: Genetic danger to farmworkers and manufacturing workers – A meta-analytical review. **Science of The Total Environment**, v. 748, 141382, 2020.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141382>
- POYNTER, J.N; RICHARDSON, M.; ROESLER, M., *et al.* Chemical exposures and risk of acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes in a population - based study. **Int. J. Cancer** 140, 23–33, 2016.
- PRESUTTI, R. *et al.* Pesticide exposures and the risk of multiple myeloma in men: An analysis of the North American Pooled Project. **International journal of cancer** v. 139,8:1703-14, 2016. doi:10.1002/ijc.30218
- QUIROS, S. *et al.* Rad51 and BRCA2 - New Molecular Targets for Sensitizing Glioma Cells to Alkylating Anticancer Drugs. **PLoS One**, 6(11): e27183, 2011. doi: 10.1371/journal.pone.0027183
- RADERSCHALL, E. *et al.* Formation of higher-order nuclear Rad51 structures is functionally linked to p21 expression and protection from DNA damage-induced apoptosis. **J Cell Sci.** 115(Pt 1):153-64, 2002. PMID: 11801733.
- RAU, A. T. *et al.* Pesticide (endosulfan) levels in the bone marrow of children with hematological malignancies. **Indian pediatrics** vol. 49,2:113-7, 2012.
doi:10.1007/s13312-012-0025-5
- REILLY, B. *et al.* DNA methylation identifies genetically and prognostically distinct subtypes of myelodysplastic syndromes. **Blood Adv.**, 3(19): 2845–2858, 2019. doi: 10.1182/bloodadvances.2019000192
- RIBEIRO, A.A & NARDOCCI, A.C. Desigualdades socioeconômicas na incidência e mortalidade por câncer: revisão de estudos ecológicos, 1998-2008. **Saude soc.**, vol. 22, n. 3, p. 878-891, 2013. <https://doi.org/10.1590/S0104-12902013000300020>
- RIBEIRO JR. *et al.* ATM polymorphism is associated with low risk myelodysplastic syndrome. **DNA Repair**, 12(2), 87–89, 2013. doi:10.1016/j.dnarep.2012.10.010
- RIBEIRO JR., H. L. *et al.* DNA repair gene expressions are related to bone marrow cellularity in myelodysplastic syndrome. **J Clin Pathol**, 0:1–11, 2017a.
doi:10.1136/jclinpath-2016-204269
- RIBEIRO JR, H. L. *et al.* Expression of DNA repair genes is important molecular findings in CD34+ stem cells of myelodysplastic syndrome. **European Journal of Haematology**, 100(1), 108–109, 2017b. doi:10.1111/ejh.12966
- RIBEIRO JR. *et al.* Polymorphisms of DNA repair genes are related to the pathogenesis of myelodysplastic syndrome. **Hematol Oncol**, 33: 220–228, 2015.
- RIBEIRO JR. *et al.* Influence of functional polymorphisms in DNA repair genes of myelodysplastic syndrome. **Leukemia Research** vol. 48, p. 62-72, 2016.
<https://doi.org/10.1016/j.leukres.2016.06.008>
- RIBEIRO JR. *et al.* Can synthetic lethality approach be used with DNA repair genes for primary and secondary MDS? **Med Oncol** 36, 99, 2019.
<https://doi.org/10.1007/s12032-019-1324-7>
- RIBEIRO, M.G *et al.* Occupational safety and health practices among flower greenhouse workers from Alto Tietê region (Brazil). **The Science of the Total Environment**. 416:121-126, 2012. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2011.11.002.
- RIGOTTO R. M. **Agrotóxicos, Trabalho e Saúde: Vulnerabilidade e Resistência**

no Contexto da Modernização Agrícola no Baixo Jaguaribe – CE. Co-edição com a Expressão Popular. – Fortaleza: Edições UFC, 2011.

RIGOTTO, R.M. *et al.* Trends of chronic health effects associated to pesticide use in fruit farming regions in the state of Ceará, Brazil. **Rev Bras Epidemiol.**, 16(3): 763-773, 2013.

ROOS, W.P. *et al.* DNA damage and the balance between survival and death in cancer biology. **Nat Rev Cancer**, 16(1):20-33 (2015). doi: 10.1038/nrc.2015.2.

ROY, R. *et al.* BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection. **Nature Reviews Cancer** 12, 68–78, 2012.

SABARWAL, A. *et al.* Hazardous effects of chemical pesticides on human health–Cancer and other associated disorders. **Environmental Toxicology and Pharmacology** Volume 63, Pages 103-114, 2018.

SARWAR, M. Indoor risks of pesticide uses are significantly linked to hazards of the family members. **Cogent Medicine**, 3:1, 2016. doi: 10.1080/2331205X.2016.1155373

SESTI *et al.* Oxidative stress-mediated biomolecular damage and inflammation in tumorigenesis. **In Vivo**, 26, pp. 395-402, 2012.

SHAH, H.K. *et al.* Organochlorine pesticides induce inflammation, ROS production, and DNA damage in human epithelial ovary cells: An in vitro study. **Chemosphere**, 246:125691, 2020. doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.125691

SHEN, K.C. *et al.* ATM and p21 cooperate to suppress aneuploidy and subsequent tumor development. **Cancer Res.**, 65(19):8747-53, 2005. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1471.

SHEN, L. *et al.* DNA Methylation Predicts Survival and Response to Therapy in Patients With Myelodysplastic Syndromes. **J Clin Oncol.** 28(4): 605–613, 2010. doi: 10.1200/JCO.2009.23.4781.

SHI, J-Y. *et al.* Genetic variations of DNA repair genes and their prognostic significance in patients with acute myeloid leucemia. **Int. J. Cancer**, 128, 233–238, 2011.

SCHUMACHER, B. *et al.* The central role of DNA damage in the ageing process. **Nature**, v. 592, p.695–703, 2021.

SILVA, P.V.P. Análise de alterações epigenéticas em trabalhadores de postos de combustíveis expostos ao benzeno no município do Rio de Janeiro. Dissertação de mestrado – Instituto Nacional do Câncer - INCA, Rio de Janeiro, 2020.

SOEJIMA, H. *et al.* Epigenetic silencing of the MGMT gene in cancer. **Biochemistry and Cell Biology**, 83(4), 429–437, 2005. doi:10.1139/o05-140

SOUSA, J. C. *et al.* Dysregulation of interferon regulatory genes reinforces the concept of chronic immune response in myelodysplastic syndrome pathogenesis. **Hematological Oncology**, v. 37, n. 4, p. 523–526, 2019.

SOUZA, W.F. *et al.* Sinalização celular em cancer. **Cienc. Cult.** vol.66 n.1, 2014. <http://dx.doi.org/10.21800/S0009-67252014000100013>

SUGIYAMA, H. WT1 (Wilms' Tumor Gene 1): Biology and Cancer Immunotherapy. **Japanese Journal of Clinical Oncology**, V. 40, Issue 5, p. 377–387, 2010. <https://doi.org/10.1093/jjco/hyp194>

- TAWARA, I. *et al.* Safety and persistence of WT1-specific T-cell receptor gene-transduced lymphocytes in patients with AML and MDS. **Blood**, 130 (18): 1985–1994, 2017. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-06-791202>
- TEODORO, M. *et al.* Genetic polymorphisms as determinants of pesticide toxicity: Recent advances. **Toxicology Reports**, vol. 6, p.564-570, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2019.06.004>
- THORSON, J.L.M. *et al.* Epigenome-wide association study for pesticide (Permethrin and DEET) induced DNA methylation epimutation biomarkers for specific transgenerational disease. **Environmental Health**, vol.19, Article number: 109, 2020. <https://doi.org/10.1186/s12940-020-00666-y>
- TOMA, M. *et al.* Eradication of LIG4-deficient glioblastoma cells by the combination of PARP inhibitor and alkylating agente. **Oncotarget**, 9(96):36867-36877, 2018. doi: 10.18632/oncotarget.26409.
- TORMO, M. *et al.* Myelodysplastic syndromes: an update on molecular pathology. **Clin Transl Oncol** 12:652-661, 2010.
- TUAL, S. *et al.* Occupational exposure to pesticides and multiple myeloma in the AGRICAN cohort. **Cancer causes & control: CCC** vol. 30,11:1243-1250, 2019. doi:10.1007/s10552-019-01230-x
- VARDIMAN, J.W. *et al.* The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. **Blood** 114(5): 937:951, 2009.
- VASSALLO, J. & MAGALHÃES, S.M.M. Síndromes mielodisplásicas e mielodisplásicas/mieloproliferativas. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** 31(4):267-272, 2009.
- VAISSIÈRE, T. *et al.* Quantitative analysis of DNA methylation profiles in lung cancer identifies aberrant DNA methylation of specific genes and its association with gender and cancer risk factors. **Cancer Research**, v. 69, n. 1, p. 243-252, 2009.
- VENKITARAMAN, A.R. Cancer Susceptibility and the Functions of *BRCA1* and *BRCA2*. **Cancer Review**, vol. 108, ISSUE 2, p.171-182, 2002. doi:[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00615-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00615-3)
- VENKITARAMAN, A.R. Cancer suppression by the chromosome custodians, *BRCA1* and *BRCA2*. **Science** 343:1470–1475, 2014.
- VUREE, S. *et al.* Genetic Variants of ATM & Non-Homologous End Joining Pathway Genes in Acute Myeloid Leukemia: A South India Case-Control Study. **Blood** 134, 2019. <https://doi.org/10.1182/blood-2019-127860>
- WIEGMANS, A.P. *et al.*, Rad51 supports triple negative breast cancer metastasis. **Oncotarget**, 5(10): 3261–3272, 2014. doi: 10.18632/oncotarget.1923
- WILLIAMS, J. *et al.* Telomere length is an independent prognostic marker in MDS but not in de novo AML. **Br J Haematol**, 178: 240-249, 2017. doi:10.1111/bjh.14666
- WU, D.H. *et al.* Hypomethylation of let-7a-3 is associated with poor prognosis in myelodysplastic syndrome. **Leuk. Lymphoma**, 58:96–103, 2017. doi: 10.1080/10428194.2016.1187273
- WUNSCH FILHO, V. *et al.* Perspectivas da investigação sobre determinantes sociais em câncer. **Physis**, v. 18, n. 3, p. 427-450, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0103-73312008000300004>

- XIE, S. *et al.* Relevance of LIG4 gene polymorphisms with cancer susceptibility: Evidence from a meta-analysis. *Scientific Reports* volume 4, Article number: 6630, 2014.
- XU, I. *et al.* Functional Variations in the ATM Gene and Susceptibility to Differentiated Thyroid Carcinoma. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 97, Issue 6, Pages 1913–1921, 2012. <https://doi.org/10.1210/jc.2011-3299>
- XU, W. *et al.* Integrative analysis of DNA methylation and gene expression identified cervical cancer-specific diagnostic biomarkers. **Sig Transduct Target Ther**, 4, 55, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41392-019-0081-6>
- YAN, Z. *et al.* Association between ATM gene polymorphisms, lung cancer susceptibility and radiation-induced pneumonitis: a meta-analysis. **BMC Pulmonary Medicine** v. 17, Article number: 205, 2017.
- YOSHIDA, K. I *et al.* Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. **Nature** 478, 64-69, 2011.
- ZÁMBORSZKY *et al.* Loss of BRCA1 or BRCA2 markedly increases the rate of base substitution mutagenesis and has distinct effects on genomic deletions. **Oncogene** 36, 746–755, 2017. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.243>
- ZEIDAN, A. M., SHALLIS, R. M., WANG, R., DAVIDOFF, A., & MA, X. Epidemiology of myelodysplastic syndromes: Why characterizing the beast is a prerequisite to taming it. **Blood Reviews**, 2018.
- ZHANG Y.Y. *et al.* Intragenic hypomethylation of DNMT3A in patients with myelodysplastic syndrome. **Clin. Chem. Lab. Med.**, 56:485–491, 2018. doi: 10.1515/cclm-2016-0142.
- ZHENG, R. *et al.* Occupational exposure to pentachlorophenol causing lymphoma and hematopoietic malignancy for two generations. **Toxicology and industrial health** vol. 31,4: 328-42, 2015.
- ZHOU, C. *et al.* Examination of ATM, BRCA1, and BRCA2 promoter methylation in patients with pancreatic cancer. **Pancreatology**, 2021. Apenas online. <https://doi.org/10.1016/j.pan.2021.03.015>
- ZHOU, T. *et al.* Myelodysplastic Syndrome: an inability to appropriately respond to damaged DNA? **Exp Hematol**. 41(8): 665–674, 2013. doi: 10.1016/j.exphem.2013.04.008
- ZHU, W.G. *et al.* Increased expression of unmethylated CDKN2D by 5-aza-2'-deoxycytidine in human lung cancer cells. **Oncogene** vol. 20, pages7787–7796, 2001.
- ZHU, H. *et al.* Transcription factors as readers and effectors of DNA methylation. **Nat Rev Genet.**, 17(9): 551–565, 2016. doi: 10.1038/nrg.2016.83

APÊNDICE A – APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA

UFC - UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ /



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Reprogramação epigenética de células tronco hematopoiéticas em indivíduos com exposição ocupacional a defensivos agrícolas e susceptibilidade a doenças hematológicas.

Pesquisador: Cristiana Libardi Miranda Furtado

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 40698620.5.0000.5054

Instituição Proponente: Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.505.895

Apresentação do Projeto:

Apresentação do Projeto:

O presente projeto propõe investigar o efeito da exposição ocupacional a defensivos agrícolas na reprogramação epigenética de células-tronco hematopoiéticas, bem como a caracterização citogenética e molecular dos indivíduos expostos, e relacionar com fatores prognósticos e susceptibilidade a doenças hematológicas. Os resultados gerados podem auxiliar prevenção de doenças como o câncer, bem como sugerir novas formas de tratamento e intervenções apropriadas que proporcionem melhor prognóstico das doenças e qualidade de vida para os participantes. Trata-se de um estudo caso-controle retrospectivo e prospectivo. O estudo retrospectivo inclui participantes submetidos a exposição ocupacional em que serão avaliados trabalhadores rurais residentes no município de Limoeiro do Norte (localizada a 198 km de Fortaleza - CE), na Macrorregião do Litoral Leste/ Jaguaribe, que, mediante assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido (Parecer consubstanciado: 2.237.826, Pesquisador Responsável Howard Lopes Ribeiro Junior). Destaca-se que, neste local, estão instaladas empresas nacionais e multinacionais do agronegócio, de pequeno e grande porte, que utilizam aditivos em grande escala na região. Os participantes expostos a defensivos agrícolas serão divididos em três grupos: trabalhadores em grande empresa agrícola (n=50); trabalhadores rurais considerados como pequenos produtores agrícolas (n=30) e trabalhadores da agricultura ecológica (n=10) que não

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

Bairro: Rodolfo Teófilo

CEP: 80.430-275

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3388-8344

E-mail: comepe@ufc.br

Continuação do Parecer: 4.505.895

utilizaram defensivos. Como grupo controle, serão utilizados 20 indivíduos saudáveis, doadores de medula óssea. Todos os participantes foram avaliados durante as consultas de seguimento e as amostras e dados encontram-se armazenadas no Laboratório de Citogenômica do Câncer. Para o estudo prospectivo, serão avaliados indivíduos portadores de SMD assistidos no ambulatório do Hospital Geral de Fortaleza, localizado na cidade de Fortaleza – CE. Serão coletadas amostras de medula óssea durante consulta de rotina para diagnóstico da doença as quais serão utilizadas no estudo dos marcadores moleculares na SMD e CTHs. Serão incluídos no estudo os pacientes que concordarem em participar mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). As amostras de medula óssea serão coletadas através de punção aspirativa no osso esterno em seringas contendo 1,5 mL de heparina após anestesia local por um médico hematologista. A separação das células mononucleadas será realizada logo após a coleta, e serão processadas conforme procedimento de rotina do Laboratório de Citogenômica do Câncer da UFC. As coletas de sangue periférico serão por meio de venopunção da veia cefálica utilizando seringas de 5mL/10mL ou com tubos a vácuo com gel separador/EDTA (5mL), cada amostra será identificada.

OBTENÇÃO DE ISOLADOS DE CÉLULAS-TRONCO (CD34+) DE MEDULA ÓSSEA: Ao diagnóstico, as amostras de medula óssea foram coletadas em tubos de vidro VacutainerR contendo EDTA e encaminhadas para a separação de células tronco CD34+ mediante uso de colunas imunomagnéticas. A partir dos tubos de amostras de medula óssea, foram isoladas as células mononucleadas por centrifugação em gradiente de Ficoll Hypaque (densidade=1.077g/dl) (Amersham Biosciences). As subpopulações específicas de células CD34+ serão obtidas por separação imunomagnética em colunas MiniMACS (Mieltenyi Biotec, Inc) de acordo com as instruções do fabricante. Por fim, foi acrescentado 750uL de TRIZOL LS Reagent® (Invitrogen, EUA) para cada 250uL de volume de PBS aplicado.

PADRÃO DE METILAÇÃO DE GENES DE REPARO, CICLO CELULAR, FUSO MITÓTICO E DE PLURIPOTÊNCIA POR NEXT GENERATION SEQUENCING: O DNA das células da MO dos participantes expostos e das CTHs extraído será modificado pelo tratamento com bissulfato de sódio (Herman et al. 1996). Para a conversão do DNA genômico, será utilizado o EpiTect Bissulfite Kit (Qiagen, Hilden Germany), de acordo com as especificações do fabricante. O DNA modificado será amplificado utilizando-se primers específicos para as regiões selecionadas, que possuem adaptadores para sequenciamento utilizando a plataforma MiSeq (Illumina NGS sequencing), with the 600 bp V3 reagents kit seguindo as recomendações do fabricante. As sequências para as regiões de estudo serão obtidas no site UCSC Genome Bioinformatics (<http://genome.ucsc.edu/>) e os sítios CpGs serão determinados pelo programa MethyPrimer (Li and Dahiya 2002). Os genes de reparo investigados serão: ATM, BRCA1, BRCA2, RAD51, XRCC5,

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

Bairro: Rodolfo Teófilo

CEP: 60.430-275

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3386-8344

E-mail: comepe@ufc.br

Continuação do Parecer: 4.505.895

XRCC6, LIG4, XPA, XPC, ERCC2, ERCC4, ERCC5, ERCC6 e ERCC8, os genes de ciclo celular e fuso mitótico serão: MAD2, CDC20, TPX2, AURKA, AURKB, CDKN1A, e como marcadores de pluripotência: H19, IGF2, KIT, SOX2, OCT4 e MYC. METILAÇÃO GLOBAL DO DNA: A porcentagem de metilação global do DNA das células da MO dos participantes expostos será realizada a partir da técnica de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), utilizando-se o Imprint Methylated DNA Quantification Kit (Sigma-Aldrich, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante. Sobrepondo os resultados das amostras com a curva controle, é possível quantificar a quantidade de metilcitosinas presentes no DNA. COMPRIMENTO DO TELÔMERO: O comprimento telomérico das células da MO dos participantes expostos será determinado pelo método quantitativo da reação em cadeia da polimerase (qPCR). Este método determina o comprimento telomérico a partir da abundância de sequência telomérica (TTAGGG) em comparação a abundância da sequência de um gene único (single gene; razão T/S), baseado no método de Cawthon, com algumas modificações (Calado et al. 2011; Cawthon 2009; Scheinberg et al. 2010).

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Investigar o efeito da exposição ocupacional a defensivos agrícolas na reprogramação epigenética de células tronco hematopoiéticas (CTHs), bem como a caracterização citogenética e molecular dos indivíduos expostos, e relacionar com fatores prognósticos e susceptibilidade a doenças hematológicas.

Objetivo Secundário:

- Fomentar um grupo multidisciplinar para a caracterização molecular e citogenética de indivíduos expostos a defensivos agrícolas no estado do Ceará;
- Caracterizar sócio clínico demograficamente a população de agricultores expostos a defensivos agrícolas no município de Limoeiro do Norte, da região do Baixo Jaguaribe no Ceará;- Identificar as alterações epigenéticas relacionadas a genes de reparo do DNA: ATM, BRCA1, BRCA2, RAD51, XRCC5, XRCC6, LIG4, XPA, XPC, ERCC2, ERCC4, ERCC5, ERCC6 e ERCC8, e genes do ciclo celular e fuso mitótico: MAD2, CDC20, TPX2, AURKA, AURKB e CDKN1A em células da medula óssea de indivíduos expostos a defensivos agrícolas;
- Avaliar o comprimento do telômero das células da medula óssea de indivíduos expostos a defensivos agrícolas;
- Avaliar a metilação global do DNA de indivíduos expostos a defensivos agrícolas;
- Cultivar e caracterizar células tronco (CD34+) de indivíduos expostos a defensivos agrícolas;

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

Bairro: Rodolfo Teófilo

CEP: 60.430-275

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3366-8344

E-mail: comepe@ufc.br

Continuação do Parecer: 4.505.895

- Avaliar a reprogramação epigenética de genes de pluripotência das CTH de indivíduos expostos a defensivos agrícolas no estado do Ceará;
- Identificar a relação e susceptibilidade com o desenvolvimento de doenças hematológicas;
- Contribuir com novas ações e tecnologias que favoreçam ao diagnóstico precoce de novos casos de câncer.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Um possível risco para o estudo prospectivo de CTHs aos trabalhadores rurais participantes da presente pesquisa é a possibilidade de existência (raras) de uma equimose (mancha arroxeadada) ao redor do local de onde foi realizada a punção esternal (retirada da medula óssea) ou coleta venosa do sangue periférico, sem a ocorrência de maiores consequências clínicas, tendo os sintomas desaparecidos em poucos dias após o procedimento.

Benefícios:

Os benefícios a serem obtidos estão relacionados a investigação científica para a identificação das alterações genéticas e epigenéticas em células de trabalhadores rurais expostos à agrotóxicos no município de Limoeiro do Norte, no Ceará, serão úteis ao SUS quanto ao advento de novas ações e tecnologias que favoreçam ao diagnóstico precoce de novos casos de câncer, especialmente os oncohematológicos, na população de agricultores do estado do Ceará.

Riscos e Benefícios:

No estudo retrospectivo com os agricultores, projeto não possui riscos no que diz respeito ao paciente, já que as amostras já foram coletadas durante a biópsia de medula necessária para o diagnóstico e tratamento da doença. Um possível risco do estudo é referente esgotamento e/ou contaminação da amostra com a impossibilidade de realização de alguns testes. Porém a seleção dos casos será feita juntamente com a equipe das instituições para evitar que isto ocorra. Ainda, os devidos cuidados de biossegurança serão tomados durante a realização do estudo.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante, com metodologia clara.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

Bairro: Rodolfo Teófilo

CEP: 60.430-275

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3366-8344

E-mail: comepe@ufc.br

Continuação do Parecer: 4.505.895

Todos os termos foram apresentados. Conforme solicitado foi acrescentado no TCLE os dados de contato do CEP/PROPESQ.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não se aplica.

Considerações Finais a critério do CEP:

Enviar o relatório final ao concluir a pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_1584414.pdf	13/01/2021 10:45:51		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_13012021.pdf	13/01/2021 10:44:35	Cristiana Libardi Miranda Furtado	Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	Autorizacao_do_chefe_servico.pdf	30/10/2020 10:01:41	Cristiana Libardi Miranda Furtado	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta_de_anuencia.pdf	30/10/2020 09:57:44	Cristiana Libardi Miranda Furtado	Aceito
Outros	ISENCAO_TCLE_CRISTIANA.pdf	30/10/2020 09:51:18	Cristiana Libardi Miranda Furtado	Aceito
Outros	AUTORIZACAO.pdf	30/10/2020 09:42:03	Cristiana Libardi Miranda Furtado	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto_Cristiana.pdf	30/10/2020 09:31:11	Cristiana Libardi Miranda Furtado	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_CRISTIANA.pdf	30/10/2020 09:28:18	Cristiana Libardi Miranda Furtado	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_PADRAO.pdf	30/10/2020 09:22:02	Cristiana Libardi Miranda Furtado	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_de_compromisso_do_pesquisador.pdf	13/08/2020 15:53:46	Cristiana Libardi Miranda Furtado	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Autorizacao_institucional.pdf	10/08/2020 15:58:02	Cristiana Libardi Miranda Furtado	Aceito
Orçamento	Orcamento.pdf	10/08/2020 15:39:23	Cristiana Libardi Miranda Furtado	Aceito
Declaração de	declaracao_concordancia.pdf	10/08/2020	Cristiana Libardi	Aceito

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

Bairro: Rodolfo Teófilo

CEP: 60.430-275

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3368-8344

E-mail: comepe@ufc.br

Continuação do Parecer: 4.505.895

concordância	declaracao_concordancia.pdf	15:35:00	Miranda Furtado	Aceito
Cronograma	Cronograma.pdf	10/08/2020 14:34:39	Cristiana Libardi Miranda Furtado	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

FORTALEZA, 21 de Janeiro de 2021

Assinado por:
FERNANDO ANTONIO FROTA BEZERRA
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

Bairro: Rodolfo Teófilo

CEP: 60.430-275

UF: CE **Município:** FORTALEZA

Telefone: (85)3386-8344

E-mail: comepe@ufc.br

APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



Universidade Federal do Ceará/UFC

Introdução: Estamos desenvolvendo uma pesquisa intitulada **Reprogramação epigenética de células tronco hematopoiéticas em indivíduos com exposição ocupacional a defensivos agrícolas e susceptibilidade a doenças hematológicas**, para a qual estamos coletando exames laboratoriais de pessoas que trabalham na plantação de banana, com o intuito de identificar os agravos à saúde daqueles que se encontram expostos.

Termo de consentimento livre e esclarecido: Estamos convidando você a participar de uma pesquisa sobre agravos à saúde relacionados à exposição a agrotóxicos em trabalhadores do cultivo da banana na Chapada do Apodi. Para isso, estamos pedindo a sua autorização para participar desta pesquisa. Neste estudo, colheremos informações sobre o seu trabalho e a sua saúde através de questionário, exame médico e análises clínicas, toxicológicas e avaliação da medula óssea, ou seja, o órgão que produz o sangue. Sua participação é importante para que se possa conhecer o perfil de saúde-adoecimento destes trabalhadores, o que pode ajudar a empresa, os órgãos públicos e os próprios trabalhadores a prevenirem eventuais problemas de saúde. Esclarecemos que a sua participação neste estudo é de caráter voluntário – você não é obrigado a participar. Você pode recusar-se a participar ou retirar seu consentimento a qualquer momento, sem penalidade alguma. Não haverá nenhum tipo de remuneração por sua participação. As informações obtidas na pesquisa são **confidenciais** e não será identificada a sua pessoa. A divulgação da pesquisa será feita em eventos e publicações científicas da área da saúde, trabalho e meio ambiente, sem mencionar os nomes dos participantes. Os procedimentos adotados nessa pesquisa não oferecem risco à sua saúde, podendo gerar desconforto durante a coleta de aproximadamente 10 ml de sangue da medula óssea e dos vasos sanguíneos. Você terá acesso aos resultados dos exames e, caso seja encontrada alguma alteração, será oferecido acompanhamento e tratamento no Hospital das Clínicas da Universidade Federal do Ceará.

Eu, _____, declaro que, após ter sido esclarecido (a) pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, aceito participar voluntariamente deste protocolo de pesquisa e permito que minhas informações sejam analisadas e utilizadas pelo estudo.

Sujeito da Pesquisa

APÊNDICE C – QUESTIONÁRIO APLICADO AOS AGRICULTORES
Questionário de Exposição aos Agrotóxicos

Você trabalha no cultivo da banana?

1. () Sim 2. () Não. Se sim há quanto tempo_____ (anos/ meses)

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

NOME: _____

DATA DE

NASCIMENTO:_____TELEFONE:_____

ENDEREÇO_____

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

PARTE 1 – CARACTERÍSTICA DEMOGRÁFICA

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

PARTE 2 - HÁBITOS DE VIDA

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

PARTE 3 - HISTÓRIA PREGRESSA FAMILIAR

312	Alguma pessoa da sua família teve algum tipo de câncer nos últimos dez anos?	<p align="center">Sim</p> Não Quem (_____) <p align="center">Não sei</p> Não respondeu	<p align="center">1</p> 2 3 88 99	→401
-----	--	--	--	------

313	Que tipo de câncer essa pessoa da sua família apresentou?	Pele	1	
		Mama	2	
		Útero	3	
		Ovário	4	
		Sangue/Leucemia	5	
		Outros (_____)	6 88	
		Não sei	99	
		Não respondeu		

PARTE 4 - CARACTERIZAÇÃO DO TRABALHO

401	Quantos anos de trabalho na agricultura você tem?	Menos de 01 ano	1	
		De 01 a 04 anos	2	
		De 05 a 08 anos	3	
		De 08 a 12 anos	4	
		Mais de 12 anos	5	
		Não sei Não respondeu	88 99	
402	Qual a sua atividade de trabalho, antes de trabalhar na agricultura?	Estudante	1	
		Autônomo	2	
		Pedreiro	3	
		Eletricista	4	
		Comerciário	5	
		Agricultor	6	
		Outros (_____)	7 99	
		Não respondeu		
405	Em qual setor da empresa você trabalha?	Administração	1	
		Setor de Química/preparação	2	
		Aplicação de químicos	3	
		Plantio	4	
		Preparação de mudas	5	
		Setor de colheitas	6	
		Setor de embalagem	7	
		Restaurante	8	
		Outro (_____)	9	
		Não respondeu	99	
406	Qual a função que você exerce em seu trabalho?	Administrador	1	
		Engenheiro	2	
		Advogado	3	
		Técnico Agrícola	4	
		Técnico de Laboratório	5	
		Técnico de segurança do Trabalho	6	
		Vigilante	7	
		Preparador de Produtos químicos	8	
		Aplicador de Agrotóxicos	9	
		Preparador de mudas	10	
		Plantador	11	
		Irigadores	12	
		Adubação	13	
		Desbaste	14	
		Eliminação de pencas ou falsa penca	15	
		Eliminação do coração	16	
		Limpeza do cacho	17	
		Escoramento das bananeiras	18	
		Desvio do cacho ou do "filho"	19	
		Rebaixamento do pseudocaule (tronco)	20	
		Embolsamento de cachos	21	
		Marcador de cacho	22	
		Rebaixador inicial	23	
		Rebaixador final	24	
		Desfolha	25	
		Colhedor de frutas	26	
		Pós-colheita	27	
		Tratorista	28	
		Cozinheiro	29	
		Outros (_____)	30 99	
Não respondeu				

PARTE 5 - CARACTERIZAÇÃO DA EXPOSIÇÃO DO TRABALHADOR

503	Se na empresa que você trabalha existe uso de agrotóxicos (veneno), você tem algum contato com eles?	<p>Sim 1</p> <p>Não 2 →601</p> <p>Não sei Não 88 →601</p> <p>respondeu 99 →601</p>
504	Qual é o tipo de contato que você tem com esses agrotóxicos (veneno)?	<p>Direto (durante a atividade de trabalho) 1</p> <p>Indireto (após aplicação, colheita, muda e outros) 2</p> <p>Durante a pulverização aérea 3</p> <p>Não sei Não respondeu 88</p> <p>99</p>

505	Em qual (ais) atividade(s) de trabalho você tem contato com agrotóxicos (veneno)?	<p>Preparação de misturas 1</p> <p>Pulverização costal 2</p> <p>Pulverização aérea 3</p> <p>Armazenamento 4</p> <p>Descarte de embalagem 5</p> <p>Limpeza de roupa 6</p> <p>Limpeza do equipamento 7</p> <p>Gotejamento contínuo 8</p> <p>Transporte 9</p> <p>Trabalho em área pulverizada 10</p> <p>Embalagem do produto final 11</p> <p>Outros 12</p> <p>(_____) 88</p> <p>Não sei 99</p> <p>Não respondeu</p>
506	Nos períodos de pulverização aérea, o seu contato com o veneno acontece:	<p>Durante a pulverização, pois você permanece em sua função 1</p> <p>Você ajuda a sinalizar para o avião com bandeira 2</p> <p>Você entra no bananal logo após a pulverização 3</p> <p>Você mora perto das áreas pulverizadas 4</p> <p>Não sei 88</p> <p>Não respondeu 99</p>
508	Quais são os agrotóxicos (veneno) que você tem contato? OBS: os que estão grifados são herbicidas	<p>Bayfidan EC 1</p> <p>Bórax 2</p> <p>Bravonil 500 3</p> <p><u>Carbofuran</u> 4</p> <p>Cercobin 500SC 5</p> <p>Cobre Atar BR 6</p> <p>Comet 7</p> <p>Cuprozeb 8</p> <p>Domark 100EC 9</p> <p><u>Finale</u> 10</p> <p>Flare 11</p> <p>Folicur 200 CE 12</p> <p>Fugiscan 700WP 13</p> <p>Garant 14</p> <p><u>Gramocil</u> 15</p> <p><u>Gramoxone 200</u> 16</p> <p>Ícarus 17</p> <p>Impact 125SC 18</p> <p>Juno 250CE 19</p> <p>Manzate 800 20</p> <p>Metiltiofan 21</p> <p>Mythos 22</p> <p>Nativo 23</p> <p>Opera 24</p> <p>Opus SC 25</p> <p>Orius 250EC 26</p> <p><u>Roundup</u> 27</p> <p>Score 28</p> <p><u>Scout NA</u> 29</p> <p>Soprano 125SC 30</p> <p>Soprano 25 EC 31</p> <p>Stratego 250 EC 32</p> <p>Sulfato de cobre 33</p> <p>Support 34</p> <p>Tango Cash 35</p> <p>Tecto SC 36</p> <p>Tilt 37</p> <p>Triade 38</p> <p>Triazol 39</p> <p>Virtue 40</p>

		Outros (_____) Não sei Não respondeu	41 88 99	
509	Há quanto tempo você trabalha com agricultura familiar?	Meses _____ Anos _____ Não sei _____ Não respondeu _____	88 99	
510	Qual é a frequência com que você entra em contato com agrotóxicos (veneno)?	Diária – horas / dia _____/_____ Semanal - dia / semana _____/_____ Mensal – semana / mês _____/_____ Anual – meses/ano _____/_____ Não sei _____ Não respondeu _____	88 99	
511	Quantos dias ou horas faz que você teve o último contato com agrotóxicos (veneno)?	Menos de 12 horas _____ de 12 a 24 horas _____ de 1 a 7 dias _____ Mais de 7 dias _____ Não sabe _____ Não respondeu _____	1 2 3 4 88 99	
512	Quais os agrotóxicos que você teve contato durante a Agricultura Familiar?	Indrec _____ Folidol _____ Folisuper _____ Azodrin _____ <u>2,4 – D</u> _____ <u>Propanil</u> _____ Tamaron (Metamidofós) _____	1 2 3 4 5 6 7	

513	Quanto tempo você trabalhou com esses agrotóxicos?	Menos de 01 ano	1
		De 01 a 04 anos	2
		De 05 a 08 anos	3
		De 08 a 12 anos	4
		Mais de 12 anos	5
		Outro (_____)	6
		Não sei	7
		Não respondeu	8

PARTE 6 - MEDIDAS DE CONTROLE DO RISCO ADOTADOS PELO TRABALHADOR

613	Qual (ais) desta(s) medida(s) de prevenção você adota em seu trabalho. Pode marcar mais de uma alternativa					
		Frequentemente	Às vezes	Nunca	NS	NR
	Luvas	1	2	3	88	99
	Máscaras	1	2	3	88	99
	Lenço	1	2	3	88	99
	Óculos	1	2	3	88	99
	Chapéu	1	2	3	88	99
	Botas	1	2	3	88	99
	Macacão	1	2	3	88	99
	Observação dos ventos	1	2	3	88	99
	Banho após o trabalho	1	2	3	88	99
Nenhuma proteção	1	2	3	88	99	

PARTE 9 – HISTÓRIA CLÍNICA DO TRABALHADOR

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

Entrevistador:

Obrigado por ter participado