



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA CLÍNICA
PROGRAMA DE MESTRADO ACADÊMICO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

LUIZ IVANDO PIRES FERREIRA FILHO

**Estudo das alterações citogenômicas da medula óssea de
trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos**

FORTALEZA

2013

LUIZ IVANDO PIRES FERREIRA FILHO

**Estudo das alterações citogenômicas da medula óssea de
trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos**

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

Orientador: Prof. Dr. Ronald Feitosa Pinheiro

FORTALEZA

2013

LUIZ IVANDO PIRES FERREIRA FILHO

**Estudo das alterações citogenômicas da medula óssea de
trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos**

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

Defesa em: 08/07/13

BANCA EXAMINADORA

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

Profa. Dra. Raquel Maria Rigotto
Membro da Banca Avaliadora
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira
Membro da Banca Avaliadora
Universidade Federal do Ceará

Profa. Dra. Fabíola Traina
Membro da Banca Avaliadora
Universidade de São Paulo – USP Ribeirão Preto

Prof. Dra. Sílvia Meira Magalhães
Membro da Banca Avaliadora
Universidade Federal do Ceará

Aos meus pais Ivando e Lidinalva

AGRADECIMENTOS

A **Todos os sujeitos dessa pesquisa** que aceitaram de forma tão sublime participar deste estudo e confiaram a um médico desconhecido perfurar o seu peito em busca de um vestígio biológico que contribuísse com a ciência.

À **Profa. Dra. Sílvia Magalhães** cuja convivência de natureza ímpar me possibilitou ampliar os horizontes, além de incentivar o interesse pela pesquisa e docência em hematologia.

Ao **Prof. Dr. Ronald Pinheiro**, grande mentor do Laboratório de Citogenômica do Câncer, cujo entusiasmo pelo ensino, pesquisa e laboratório associado ao rigor e à disciplina continuam a ser essenciais à minha formação como hematologista.

À **Profa. Dra. Raquel Rigotto** que me recebeu de braços abertos e me abriu todas as portas do Núcleo TRAMAS, permitindo que eu adentrasse de forma segura na complexa região do agronegócio.

Ao **Prof. Dr. Edson Holanda** que além de aceitar prontamente participar da banca de defesa desta dissertação conseguiu despertar o meu interesse pela pesquisa durante sua brilhante aula no módulo de iniciação à residência de clínica médica nos tempos da UFC – Sobral (esses planos tiveram que ser adiados por 4 anos).

À **Juliana Cordeiro e Roberta Taiane** (profa. Taty) que se dedicaram com imenso carinho a todos os detalhes da organização deste projeto, participando ativamente de todas as etapas além de oferecerem um ombro amigo nos momentos mais difíceis.

Ao **Howard Ribeiro** que conseguiu entender o valor do trabalho em equipe e superar o espírito competitivo para fornecer preciosa colaboração e incentivo no momento crucial deste trabalho.

A todos os alunos de pós-graduação do Laboratório de Citogenômica do Câncer: **Fabíola Fernandes, Alan Rodrigo, Geane Felix, Kelly Roveran e Leonardo Feitosa** que juntos formam um excelente time.

A todos os estudantes de iniciação científica, **Marília Braga, Izabelle Farias, Ivna Baltazar, Lia Simonetti, Raphael Gadelha, Julia Duarte e André Oliveira**, por todo o apoio durante as aventuras da coleta de amostras e pelo trabalho árduo nas madrugadas para processamento das culturas de medula óssea, além da grande satisfação que é ter vocês por perto.

Às enfermeiras **Germana Perdigão e Marta Vânia** que com grande entusiasmo se ofereceram para contribuir na coleta de amostras de sangue periférico, mesmo sabendo do perigo que corriam.

Aos camaradas **Reginaldo** (Central Sindical Popular) e **Adailton** (Movimento Sem-Terra) que não mediram esforços na mobilização dos trabalhadores rurais e durante todas as aventuras do processo de coleta de amostras permaneceram firmes no propósito comum de lutar contra os agrotóxicos.

RESUMO

Os pesticidas são produtos químicos de uso disseminado no controle das pragas nas lavouras agrícolas. Estes produtos são classificados em herbicidas, inseticidas e fungicidas e podem acumular-se no meio ambiente. Um grande número de estudos epidemiológicos em trabalhadores rurais sugeriu um aumento do risco de câncer no grupo exposto a pesticidas. O objetivo deste estudo é avaliar a presença de anormalidades cromossômicas em células da medula óssea e alterações do gene *TP53* por FISH em trabalhadores rurais expostos a pesticidas. Para o nosso conhecimento, este é o primeiro estudo a avaliar estas alterações utilizando células-tronco hematopoéticas coletadas por aspirado da medula óssea. Foram avaliados 43 trabalhadores rurais do sexo masculino e detectadas anormalidades cromossômicas através de citogenética por Banda G em 11 (25%). A maioria destas anomalias era relacionada com aneuploidias (6/11). Aneuploidias podem ocorrer devido a um cromossomo extra ou ausente. De extrema importância, encontramos quatro casos com anormalidades estruturais relacionadas aos cromossomos 4, 5, 7 e 11, como deleções do braço longo dos cromossomos 5, 7 e 11. Detectamos supressão do gene *TP53* por Hibridização por Fluorescência in situ (FISH) em 4/31 e de amplificação em 3/31 casos. As outras alterações por FISH foram relacionadas à aneuploidia (6/31). Entre as anormalidades numéricas, encontramos tetrassomia em 3 casos, trissomia em dois casos e monossomia em um caso. Nosso trabalho é o primeiro a apresentar anomalias citogenéticas em células da medula óssea de trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos. Nosso estudo destaca a importância da prevenção primária, pois apenas 23% dos trabalhadores rurais relatou medidas de proteção. Todas essas anormalidades citogenéticas aqui detectadas são descritas como responsáveis por aumentar o risco de desenvolvimento de neoplasias. Como o uso de agrotóxicos está disseminado em nossa agricultura, os trabalhadores rurais devem evitar o uso impróprio devido ao risco de desenvolver neoplasias.

Palavras-chaves: Pesticidas; Alterações Cromossômicas; Gene *TP53*

ABSTRACT

Chemical pesticides are disseminated for controlling pests on agricultural crops. These chemical are classified into herbicides, insecticides and fungicides and accumulate in the environment. A large number of epidemiological studies in rural workers have suggested an increased risk of cancer in the exposed pesticide group. The aim of this report is to evaluate the presence of chromosomal abnormalities of bone marrow cells and the status of gene *TP53* by FISH in rural workers exposed to pesticides. To the best of our knowledge, this is the first report to evaluate these abnormalities using hematopoietic stem cells collected by bone marrow aspiration. We evaluated 43 male rural workers and detected chromosomal abnormalities in 11 (25%). The majority of these abnormalities were related to aneuploidy (7/11). Aneuploidy may be due to an extra or missing chromosome. Of utmost importance, we found four cases with structural abnormalities related to chromosomes 4, 5, 7 and 11 like deletions of long arm of chromosomes 5, 7 and 11. We detected deletion of *TP53* gene in 4/31 and amplification in 3/31 of cases. The other abnormalities were related to aneuploidy (6/31). Between the numerical abnormalities, we found tetrasomy in 3 cases, trisomy in 2 cases and monosomy in 1 case. Our report is the first one to present cytogenetic abnormalities of bone marrow cells of rural workers. Our study highlights the importance of primary preventive because only 23% of rural workers reported protective measures. All these cytogenetic abnormalities here detected are reported to increase the risk of developing malignancy. The use of pesticides is disseminated in our agriculture, so rural workers must avoid improper use due to risk of neoplasia..

Key Words: Pesticides; Chromosomal Abnormalities; *TP53* Gene

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Localização geográfica da Chapada do Apodi entre os estados do Ceará e Rio Grande do Norte	24
Figura 2: Utilização de agrotóxicos no Brasil de acordo com os municípios dos estabelecimentos produtores agrícolas	25
Figura 3: Represa que abastece o perímetro irrigado e a comunidade na Chapada do Apodi	27
Figura 4: Mecanismos de perda de heterozigose e inativação de gene tipo selvagem	33
Figura 5: Esquema da carcinogênese após sucessivas alterações genéticas nas células	34
Figura 6: Modelo de carcinogênese pela via das aneuploidias	35
Figura 7: Esquema da ação do gene <i>TP53</i> no ciclo celular	36
Figura 8: Esquema da ação do gene <i>TP53</i> como indutor de apoptose e prevenção do surgimento de neoplasias	37
Figura 9: Ilustração da evolução para transformação leucêmica em células tronco da medula óssea	40
Figura 10: Sequência esquemática da citogenética por Banda G de cultura de células da medula óssea.	47
Figura 11: Sequência esquemática do processo de Hibridização in situ por Fluorescência (FISH) para o gene <i>TP53</i> de material obtido de cultura de células da medula óssea	49
Figura 12: Caracterização dos trabalhadores rurais quanto ao grupo de exposição aos agrotóxicos	51
Figura 13: Caso 25 revela deleção do braço longo do cromossomo 11	56
Figura 14: Caso 8 revela deleção do braço longo do cromossomo 5 e também do braço longo do cromossomo 7	56
Figura 15: Caso 19 revela deleção do braço longo do cromossomo 7 e material adicional no cromossomo 4, além da presença de um cromossomo marcador	57

Figura 16: Caso 43 revela deleção do braço longo do cromossomo 11	57
Figura 17: Caso 29 revela material adicional no cromossomo 4	58
Figura 18: Caso 42 revela hipodiploidia	58
Figura 19: Fotomicrografia de microscópio de fluorescência do gene <i>TP53</i> e do centrômero do cromossomo 17	60
Figura 20: Representação esquemática dos resultados obtidos neste trabalho	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação dos pesticidas quanto à toxicidade.	30
Tabela 2: Características dos trabalhadores rurais estudados.	52
Tabela 3: Tempo total de exposição aos agrotóxicos em anos dos trabalhadores rurais estudados	52
Tabela 4: Lista dos pesticidas utilizados pelos trabalhadores rurais.	53
Tabela 5: Percentual de uso de equipamentos de proteção individual pelos trabalhadores rurais.	53
Tabela 6: Resultados da Citogenética e FISH para o gene <i>TP53</i>	55
Tabela 7: Frequência de deleções, aneuploidias e amplificação do gene <i>TP53</i>.	59

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Lista de agrotóxicos utilizados na monocultura da banana de acordo com a praga a ser combatida e classificação por grupo químico e classe toxicológica 28

Quadro 2: Lista de estudos epidemiológicos que estabeleceram forte associação entre a exposição crônica a agrotóxicos e o desenvolvimento de câncer 38

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	
1.1	Agrotóxicos como problema de saúde pública	23
1.2	Pesticidas utilizados na região estudada	27
1.3	Carcinogênese química	31
1.4	Correlação entre pesticidas e neoplasias	38
1.5	Vigilância à saúde do trabalhador	42
2	OBJETIVOS	
2.1	Objetivo geral	44
2.2	Objetivos específicos	44
3	MATERIAL E MÉTODOS	
3.1	Tipo de estudo	45
3.2	População do estudo	45
3.3	Coleta de dados	45
3.4	Análise Laboratorial	46
3.5	Material e Método	46
3.5.1	Citogenética Clássica	46
3.5.2	Hibridação in situ por fluorescência (FISH)	48
3.6	Análise estatística	49
3.7	Considerações éticas	50
4	RESULTADOS	
4.1	Caracterização da população estudada	51
4.2	Avaliação Hematológica	54
4.3	Citogenética por Banda G	54

4.4	Avaliação do gene <i>TP53</i> por FISH	59
5	DISCUSSÃO	61
6	CONCLUSÃO	68
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
8	APÊNDICES	76

1 INTRODUÇÃO

1.1 - Agrotóxicos como problema de saúde pública

A saúde de uma população mantém estreita relação com as alterações provocadas ao meio ambiente pelo homem e com os resíduos gerados nesse processo. Estes resíduos podem ser de natureza sólida ou até mesmo contaminantes químicos potencialmente tóxicos para os seres vivos com capacidade de se propagar pelo solo e pela água. Uma das grandes preocupações atuais é o uso indiscriminado de agrotóxicos na agricultura brasileira (Augusto et al., 2012). A aplicação de agrotóxicos é, provavelmente, a única atividade em que a contaminação do ambiente de trabalho é realizada de forma intencional (Machado et al. 2007). Esse quadro se agrava à medida que o país passa da condição de subsistência à de principal exportador de derivados agrícolas, quando a economia é fortalecida pela indústria do agronegócio (IBGE, 2009).

Dentre os agravos à saúde relacionados ao processo produtivo rural, os de maior relevância e impacto negativo para a saúde humana e ambiental são as contaminações e intoxicações relacionadas aos agrotóxicos (Pignati, 2007). Segundo a Lei Federal nº7. 802 de 11/07/1989 (BRASIL, 1989), agrotóxicos são:

Produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento.

Dados da ANVISA registram que em 2008 o Brasil se tornou o maior consumidor mundial de agrotóxicos, ultrapassando o mercado dos Estados Unidos. No mesmo ano, o governo brasileiro instituiu o plano integrado de vigilância em saúde de populações expostas a agrotóxicos (BRASIL, 2009), devido à repercussão no âmbito da saúde dos trabalhadores e

das comunidades que vivem próximas às áreas produtivas. Esse plano visa combater o uso abusivo de substâncias tóxicas na agricultura, muitas delas já proibidas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, na tentativa de prevenir o agravo à saúde das pessoas envolvidas nesse processo. Assim como as ações e atividades do setor saúde relacionadas aos agrotóxicos, a magnitude das intoxicações por agrotóxicos também não está claramente estabelecida atualmente no Brasil (Bueno et al., 2009).

Segundo dados do Censo Agropecuário de 2006, o Ceará é o quarto estado do Brasil em número de estabelecimentos que usam agrotóxicos, ficando atrás apenas dos estados da Bahia, Minas Gerais e Rio Grande do Sul (IBGE, 2006).

No Estado do Ceará, a 200 km de Fortaleza está localizada a Chapada do Apodi, que compreende uma área de 2.421,8 km² e engloba os municípios de Aracati, Jaguaruana, Quixeré, Limoeiro do Norte, Tabuleiro do Norte, Alto Santo e Potiretama.

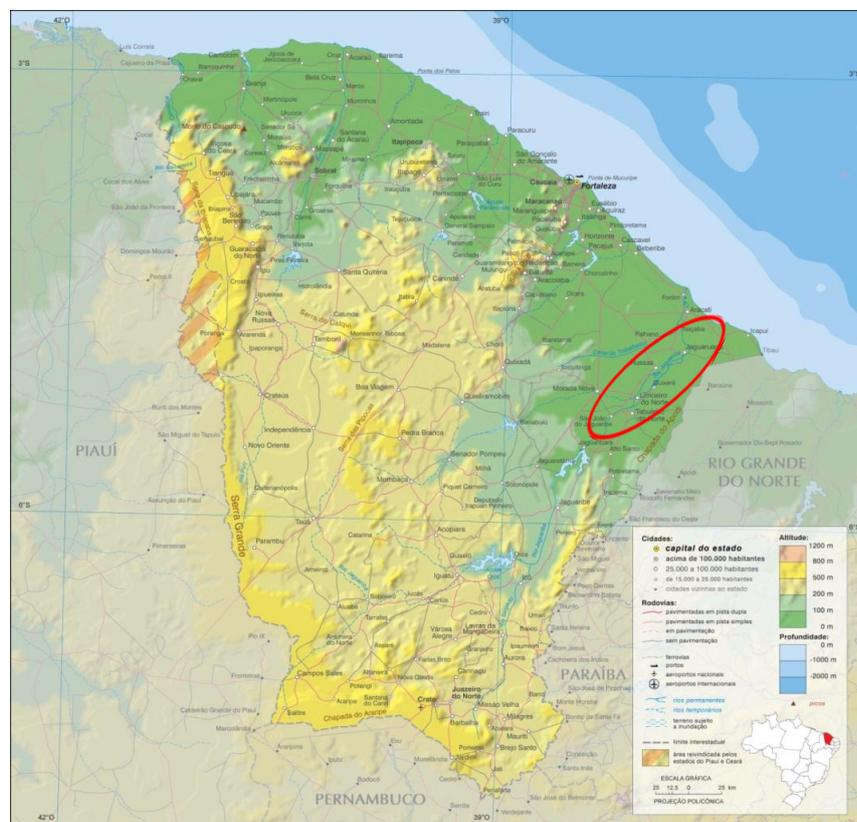


Figura 1 – Localização geográfica da Chapada do Apodi entre os estados do Ceará e Rio Grande do Norte. Fonte: IBGE 2009

De acordo com levantamento do censo Agropecuário de 2006, os municípios da região da Chapada do Apodi estão entre os que possuem maior número de estabelecimentos agrícolas que utilizam agrotóxico no Brasil.

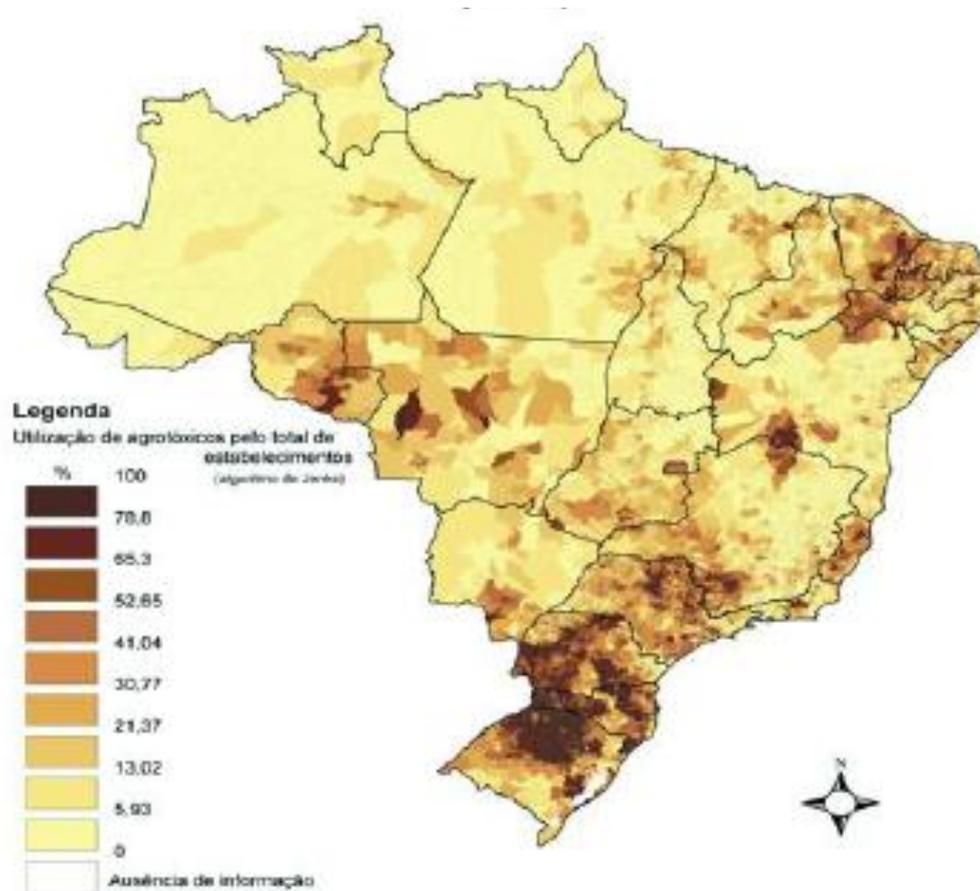


Figura 2 – Utilização de agrotóxicos no Brasil de acordo com os municípios dos estabelecimentos produtores agrícolas. Fonte: Censo Agropecuário 2006.

Nesta região estão instaladas empresas nacionais e multinacionais produtoras de frutas em regime de monocultura desde o ano 2000. A região se destaca pelo agronegócio da banana, que utiliza as terras férteis do perímetro irrigado da chapada e a mão de obra dos pequenos produtores locais. Essas empresas realizam pulverização de agrotóxicos nas lavouras em larga escala tanto com o auxílio de tratores como de aviões (Rigotto et al., 2011).

A expansão do agronegócio caracteriza-se por transformações nas condições de trabalho e no meio ambiente. Os pequenos agricultores que faziam uso sazonal de uma grande variedade de agrotóxicos em suas culturas de subsistência passam a ser empregados do agronegócio. A partir desse momento, começam a trabalhar na monocultura da banana e entram em contato contínuo com o elevado número de produtos químicos utilizados. Além disso, os trabalhadores frequentemente estão expostos a uma nuvem tóxica sempre que adentram as plantações, tornando a exposição diária e constante (Rigotto et al., 2010).

Segundo os Estudos de Impacto Ambiental - EIA, realizados na região, entre os impactos apontados, podemos mencionar as agressões que ocorrem nas reservas hídricas, ocasionadas pelo escoamento de águas contaminadas por agrotóxicos, produtos químicos diversos e fertilizantes para as camadas mais profundas, inclusive o lençol freático.

Um grande aquífero chamado Jandaíra está localizado sob parte do Ceará e do Rio Grande do Norte. Nos dois estados, a região que cobre o aquífero tem sido ocupada por empresas de fruticultura e perfurada para a extração de água para irrigação (Londres, 2011). São poços artesianos profundos, alguns com mais de 100 metros de profundidade. A Companhia de Gestão dos Recursos Hídricos do Ceará resolveu monitorar a água desses poços e escolheu dez deles para coletar amostras para análise de resíduos de agrotóxicos, tendo encontrado produtos químicos agrícolas em 6 deles (Londres, 2011).

Recentemente, um estudo da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará- UFC, após análise de 46 amostras de água da região, constatou a presença de 22 princípios ativos de agrotóxicos na água consumida pela comunidade, o que faz dessa água uma ameaça à saúde de todos que a ingerem (Londres, 2011). Dentre os produtos químicos encontrados na água das torneiras podemos citar: Abamectina, Carbofurano, Fosetil, Procimidona, Endosulfan, Ciromazina, Deltametrina, Epoxiconazol, Glifosato, Procloraz, Cletodim, Difenconazol, Azoxistrobina, Fenitrotiona, Imidacloprido, Flumioxazina,

Tebuconazol, epraloxidim, Carbaril, Epoxiconazol, Piraclostrobina e Clorpirifós (Rigotto et al., 2010).



Figura 3: Represa que abastece o perímetro irrigado e a comunidade na Chapada do Apodi.

1.2 – Pesticidas utilizados na região estudada

Os trabalhadores do agronegócio são os que estão expostos a quantidades mais elevadas de agrotóxicos e de forma mais constante. O contato ocorre quase todos os dias, seja durante a pulverização ou durante o trabalho em locais que foram pulverizados recentemente (Rigotto et al., 2011).

Entre os agrotóxicos utilizados em larga escala na monocultura da banana podemos destacar os mencionados no quadro abaixo:

Quadro 1: Lista de agrotóxicos utilizados na monocultura da banana de acordo com a praga a ser combatida e classificação por grupo químico e classe toxicológica.

Fruta	Praga/Aplicação	Venenos Utilizados	Grupo Químico	Classe Toxicológica	Classe Ambiental
Banana	Moleque da Bananeira Ou Broca-do-rizoma (Cosmopolitessordidus)	Carbofuran (Furadan)– Carbofurano	Carbamatos	I (Extremamente Tóxico)	II
		Gramoxil (Paraquate + Diuron)	Bipiridílio	II (Altamente Tóxico)	II
		Gramoxone (Paraquate)		I (Extremamente Tóxico)	II
		Score (Difenoconazol)	Triazóis	I (Extremamente Tóxico)	II
	Sigatoka Amarela	Propiconazol	Triazóis	II (Altamente Tóxico) e III (Medianamente Tóxico)	II
		Trifloxistrobina	Estrobilurina		
		Tebuconazol	Triazóis		
		Piraclostrobina	Estrobilurina		
		Epoxiconazol	Triazóis		

LEGENDA: Classe ambiental II – Muito perigoso

Adaptado de Rigotto et al., 2011. Agrotóxicos, trabalho e saúde.

Além dos pesticidas utilizados em larga escala no agronegócio da banana, os trabalhadores da região estão expostos desde o início da sua vida laborativa a uma diversidade de produtos químicos utilizados nas suas lavouras de agricultura familiar. Esta prática além de bastante disseminada, não permite critérios de escolha do produto a ser utilizado. A exposição é múltipla, envolvendo no mínimo quatro tipos de produtos diferentes, sendo que o contato com os produtos ocorre em caráter sazonal, permitindo intervalos entre a exposição (Rigotto et al., 2011).

O glifosato é o herbicida mais vendido no Brasil e no mundo (Londres, 2011). Considerado pelos usuários muitas vezes como um produto mais fraco, talvez pela classificação da ANVISA como pouco tóxico, é um dos mais conhecidos pela população da região. Em 2008, a ANVISA incluiu o glifosato entre os 14 ingredientes ativos que foram colocados em reavaliação toxicológica, pelo seu risco de elevada toxicidade (Carneiro et al., 2012).

O maior agravante em relação à exposição desses trabalhadores é o fato de não disporem de equipamentos de proteção individual adequados durante o contato com os agrotóxicos. Outra questão que merece ser discutida é a eficácia e a disponibilidade desses equipamentos. O equipamento recomendado para evitar a inalação do produto tóxico é a máscara com filtro de carvão ativado, que precisa ser trocado periodicamente (Veiga, 2007). Esta máscara, na maior parte das vezes, não está disponível, portanto o trabalhador fica exposto pelo não fornecimento dos equipamentos pelo empregador ou pela falta de recursos do pequeno produtor para adquiri-los (Rigotto et al., 2011).

Os agrotóxicos compreendem um grupo heterogêneo de agentes químicos desenvolvidos para o controle de uma variedade de pragas nas plantações. Eles são classificados de acordo com o tipo de praga a ser combatida em: inseticidas, herbicidas ou fungicidas (Bolognesi, 2001). A maioria desses produtos é composta por agentes lesivos ao ser humano como hidrocarbonetos aromáticos, organofosforados, carbamatos e organoclorados, entre outros, e tem a capacidade de se acumular no meio ambiente por vários anos. Vale ressaltar que além dos elementos químicos utilizados diretamente no controle de pragas, fazem parte da sua composição veículos de contaminação, liberados nas reações químicas durante a sua síntese. Como exemplo desses componentes podemos citar o benzeno, elemento sabidamente mielotóxico e carcinogênico (IARC, 2008).

Os agrotóxicos são divididos em classes toxicológicas (TABELA 01) pela capacidade que eles têm em provocar a morte de metade dos animais expostos a determinada concentração. Esta dose, chamada DL 50 é a dose necessária de uma dada substância para matar 50% de uma população em teste. A sua determinação é feita expondo cobaias a diferentes doses da substância até ser determinada aquela que mata apenas metade da população testada. A DL50 é frequentemente usada como um indicador da toxicidade aguda de uma substância; quanto maior a dose que será letal, menos tóxica é considerada.

Tabela 1 – Classificação dos Agrotóxicos segundo os efeitos à saúde humana

Classe Toxicológica	Descrição	Faixa Indicativa
I	Extremamente Tóxicos DL50 < 0,05g/kg	Vermelho Vivo
II	Muito Tóxicos DL50 - 0,05 a 0,5 g/kg	Amarelo Intenso
III	Moderadamente Tóxicos DL50 - 0,5 a 5 g/kg	Azul Intenso
IV	Pouco Tóxicos DL50 > 5g/kg	Verde Intenso

Fonte: BRASIL, 1997 e Peres, 2003.

Entre os pesticidas mais utilizados na região podemos destacar o carbofurano como potencial carcinogênico; o metamidofós e o paration como potencialmente pré-carcinogênicos e o monocrotofós e o glifosato como não carcinogênicos. No entanto, devido a recentes estudos que apontam efeitos deletérios do glifosato, este pesticida e vários outros estão sendo reavaliados quanto à sua classificação pela ANVISA.

Alguns desses agentes são capazes de produzir efeito carcinogênico através de vários mecanismos tais como: genotoxicidade, promoção tumoral, ativação hormonal e imunotoxicidade (Blair, 2009).

1.3 – Carcinogênese química

Os agentes químicos carcinógenos podem ser divididos em genotóxicos e não genotóxicos. Os primeiros são capazes de alterar quantitativa ou qualitativamente o genoma celular, ao passo que os últimos não interagem com o DNA, mas modulam o crescimento e a apoptose celular, potencializando o efeito genotóxico. Esses compostos, em altas doses, podem causar proliferação celular e quebras de fitas simples ou duplas do DNA (Hoeijmakers, 2009).

Normalmente, os efeitos carcinogênicos desses agentes são minimizados pela ação de enzimas da família do Citocromo P450 que atuam no processo de oxidação/ativação (fase I) e conjugação/detoxificação (fase II) desses compostos (Oliveira e cols. 2007). A inativação de xenobióticos facilita a excreção e eliminação do organismo, preservando a integridade celular (Kvitko e cols. 2008).

Após ultrapassarem a membrana da célula, são metabolizados em compostos eletrofilicos que penetram no núcleo e interagem com o material genético, ocasionando alterações estruturais e instabilidade genômica (Oliveira et al., 2007). Esta é chamada Fase de Iniciação, e constitui o primeiro passo para a carcinogênese.

A carcinogênese é um processo que necessita de múltiplas etapas até que a célula adquira uma proliferação anormal. As lesões ao material genético representam um processo importante e constituem o primeiro passo para a transformação neoplásica (Barret, 1993). Várias formas de alterações genéticas têm sido descritas nas neoplasias humanas.

Os danos ao material genético levam a uma instabilidade genômica e podem ocorrer em decorrência de mutações pontuais ou alterações cromossômicas, tais como deleções, inserções, translocações, ampliações (Pinheiro et al., 2008). As mutações podem ser classificadas em gênicas, quando afetam a sequência de nucleotídeos de um determinado gene e cromossômicas, quando interferem com os cromossomos. As mutações cromossômicas

podem ainda ser subdivididas em numéricas ou estruturais. As aberrações numéricas alteram o número de cromossomos levando ao aparecimento de aneuploidias ou poliploidias. As aberrações estruturais ocorrem quando parte da estrutura do cromossomo é alterada, levando à ocorrência de deleções ou translocações (Coleman, 2006). A maior parte destas alterações pode ser observada sob a forma de alterações citogenéticas ou alterações numéricas dos cromossomos destas células. A maior consequência dessas alterações é a perda ou alteração da expressão de genes localizados nos segmentos cromossômicos afetados, resultando na perda de função das proteínas codificadas por estes genes.

Na figura abaixo podem ser observados os diferentes tipos de mutação que podem interferir na função de um determinado gene e conseqüentemente da proteína codificada por ele. Neste exemplo, o primeiro passo para a carcinogênese possui característica herdada e o segundo passo seria a ocorrência de uma mutação no seu alelo dominante. Esse mecanismo é chamado de perda da heterozigose e pode explicar a transmissão familiar da predisposição a determinados tipos de câncer (Foulkes, 2008).

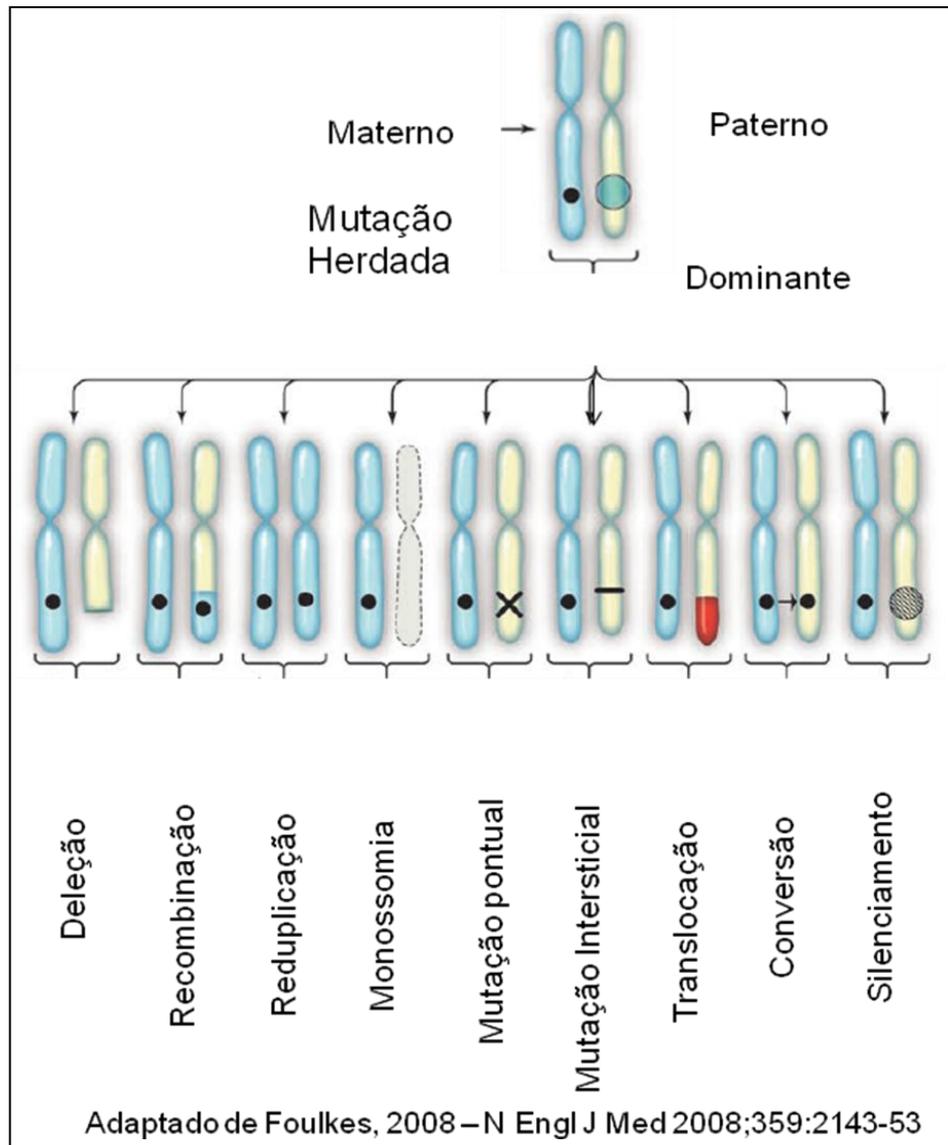


Figura 4 - Mecanismos de perda de heterozigose e inativação de gene tipo selvagem.

O desenvolvimento de uma neoplasia ocorre quando o dano na estrutura do DNA da célula se torna irreversível e, além disso, ocorre proliferação das células transformadas, esta é chamada Fase de Promoção (Oliveira et al., 2007). O conceito de iniciação e promoção é baseado em estudos para o desenvolvimento de câncer em modelos experimentais.

Evidências demonstram que a massa tumoral origina-se de uma única célula que contraiu as alterações genéticas, conhecidas como clones tumorais (Figura 5). Esses clones surgem após um processo seletivo local que leva a uma expansão clonal das células dotadas de maior capacidade proliferativa (Aparício, 2013). A expansão clonal das células alteradas representa o fenômeno mais importante do processo de carcinogênese (Coleman, 2006).

A Leucemia Mielóide Crônica é um tipo de tumor que reforça esta teoria, pois em quase todos os casos as células leucêmicas têm o mesmo tipo de translocação entre os cromossomos 9 e 22 (Cromossomo Filadélfia). O mesmo padrão é observado em neoplasias de linfócitos B (Linfomas Não-Hodgkin), em que todas as células do tumor possuem o mesmo tipo de rearranjo no gene que codifica a cadeia das imunoglobulinas (Gauduchon, 2004).

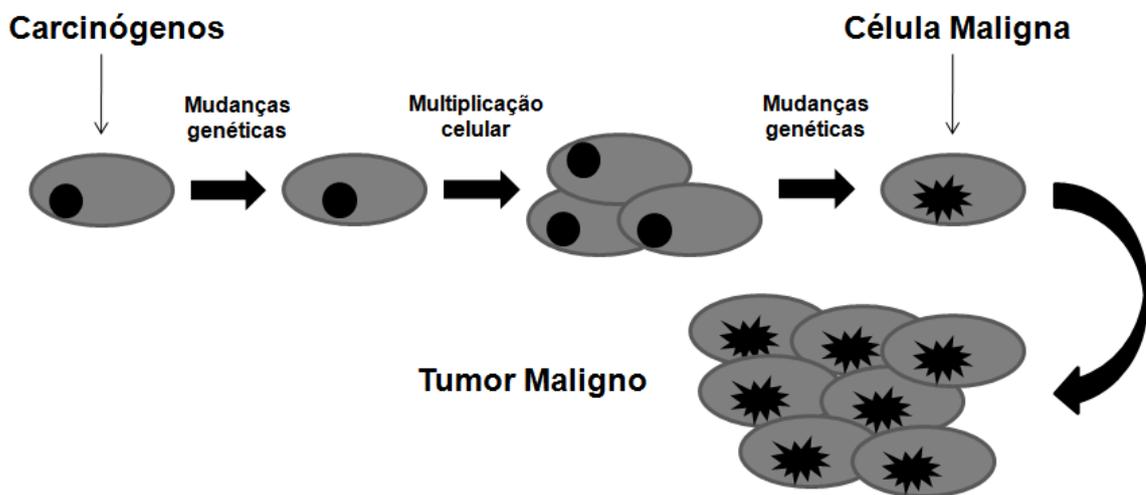


Figura 5 – Esquema da carcinogênese após sucessivas alterações genéticas nas células.

Outro modelo de carcinogênese proposto por Duesberg é o modelo pela via das aneuploidias. De acordo com esse modelo, uma mutação em genes que regulam o ciclo celular pode levar a uma segregação incorreta das cromátides irmãs durante o processo de divisão celular e ocorrer a formação de uma célula filha aneuplóide. Essa aneuploidia promove um aumento da instabilidade genômica na célula suficiente para alterar a expressão de oncogenes e genes supressores tumorais. O aumento dessa instabilidade genômica após sucessivas divisões celulares levaria à formação de clones tumorais aneuplóides (Figura 6).

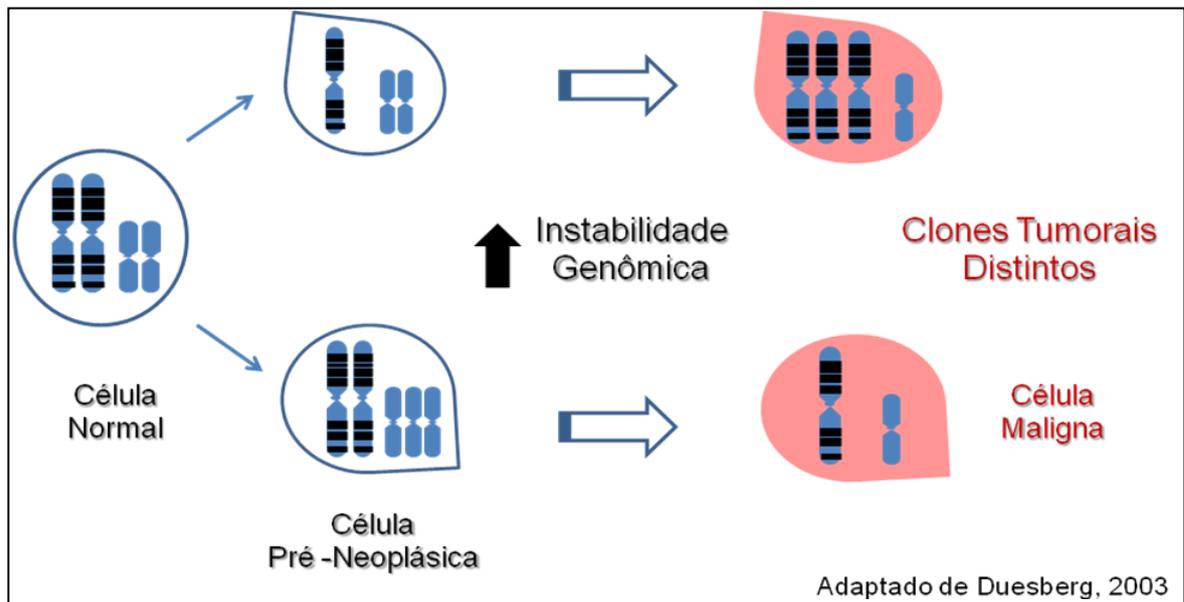


Figura 6 – Modelo da Carcinogênese pela via das aneuploidias. As barras verticais com bandas são os cromossomos das células, as células no formato de gota representam erro no processo de segregação das cromátides irmãs em que houve separação incorreta (não diplóide) dos cromossomos durante a divisão celular.

Outros mecanismos de defesa da célula contra a ação de xenobióticos são o sistema de reparo do DNA e os genes supressores tumorais. Entre eles, um dos mais importantes é o gene *TP53*, localizado na região p13 do cromossomo 17. Esse gene codifica uma proteína que, ao identificar danos na estrutura do DNA, bloqueia a divisão celular na fase G1 (Figura 7) e

coordena respostas localizadas para facilitar o reparo do dano ou induzir apoptose da célula, caso não seja possível reparar a lesão encontrada (A Petitjean et al., 2007; Hoeijmakers, 2009).

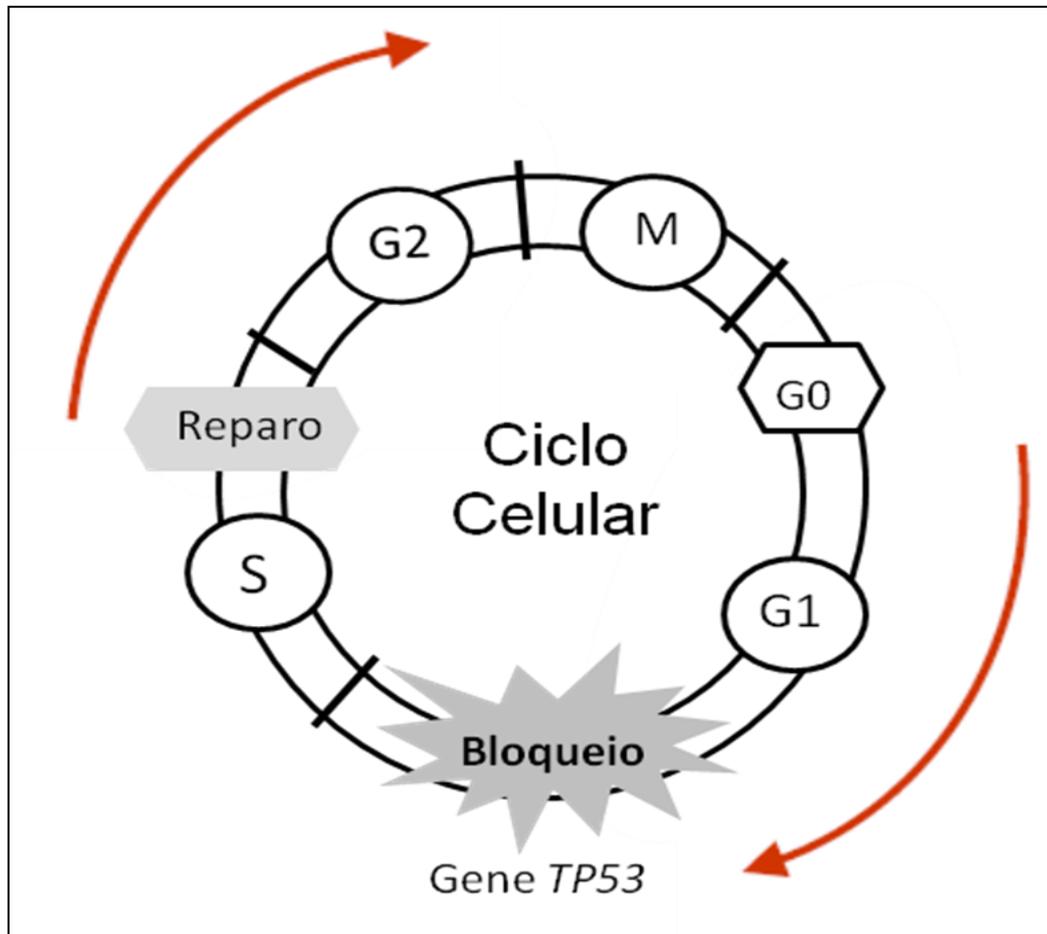


Figura 7 – Esquema da ação do gene *TP53* no ciclo celular

Quando as mutações ocorrem em proto-oncogenes ou genes supressores tumorais, estes genes deixam de exercer o seu papel de defesa, ocorrendo várias alterações na célula que se traduzem na expressão de proteínas anômalas e falha no controle do ciclo celular (Roy, 2007). Essas mutações podem resultar na hiperexpressão de oncogenes e provocar uma proliferação celular descontrolada, a chamada fase de transformação neoplásica (Blair, 2009).

Vários genes supressores de tumor têm sido estudados nas diversas neoplasias, porém o mais mutado é o gene *TP53* (A Petitjean et al., 2007; Olivier, 2010). Dados da IARC (International Agency for Research on Cancer) indicam que o *TP53* está mutado em 30 a 50% dos casos de câncer em humanos (Smith, 1995; Olivier, 2010). Este gene é composto de 11 exons, gerando uma proteína de 52kDA com importante atividade supressora de tumor. Em condições normais, a proteína p53, codificada pelo gene *TP53*, está presente em baixos níveis no citoplasma, sendo inativada por ligação à mdm2. Uma vez ativado o gene *TP53*, a célula pode percorrer dois caminhos. No primeiro momento, o ciclo celular é interrompido para que o sistema de reparo do DNA perceba se o dano é ou não reversível. Se for reversível, é feita a correção ou reparo. Caso o dano seja irreversível, haverá ativação da via das caspases com ativação da caspase-3, a grande efetora do fenômeno de apoptose (morte celular programada). Se o gene *TP53* estiver mutado e o dano celular não for corrigível, a célula poderá progredir à transformação neoplásica (Figura 8).

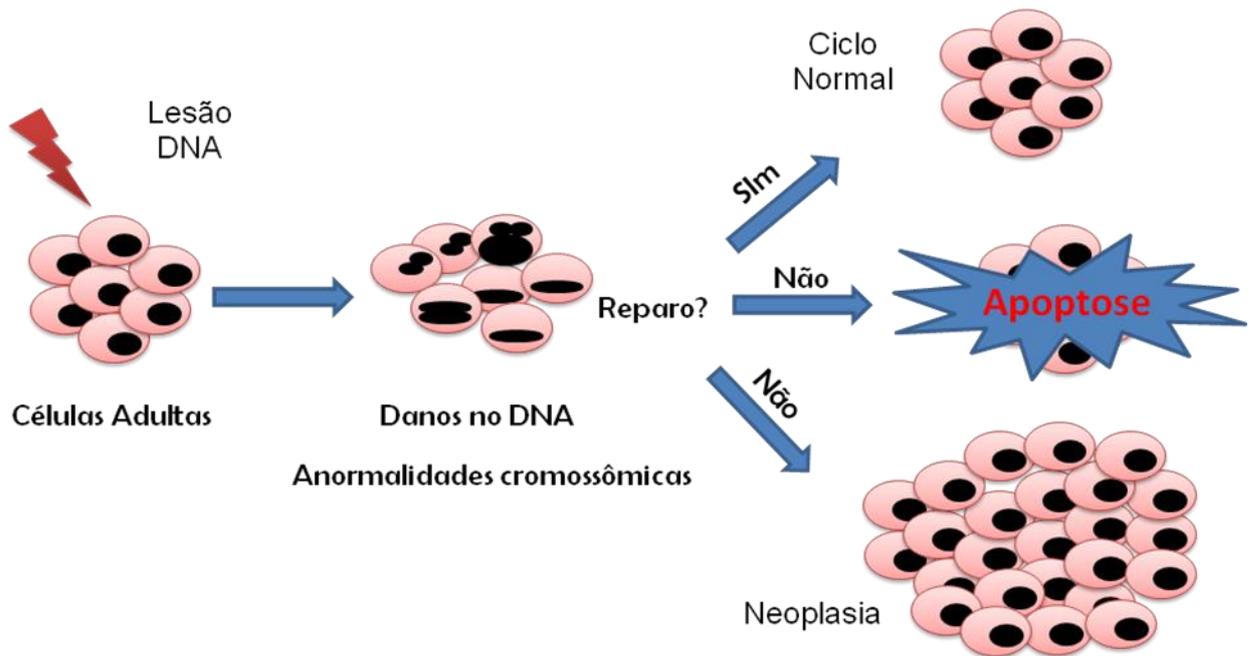


Figura 8: Esquema da ação do gene TP53 como indutor de apoptose e prevenção do surgimento de neoplasias.

1.4 – Correlação entre pesticidas e neoplasias

Vários estudos epidemiológicos têm estabelecido uma estreita relação entre a exposição a pesticidas e o desenvolvimento de alguns tipos de câncer como Linfomas Não-Hodking e diferentes tipos de leucemias. Os estudos com maior força de evidência estão relacionados no quadro abaixo.

Quadro 2 – Lista de estudos epidemiológicos que estabeleceram forte associação entre a exposição crônica a agrotóxicos e o desenvolvimento de câncer.

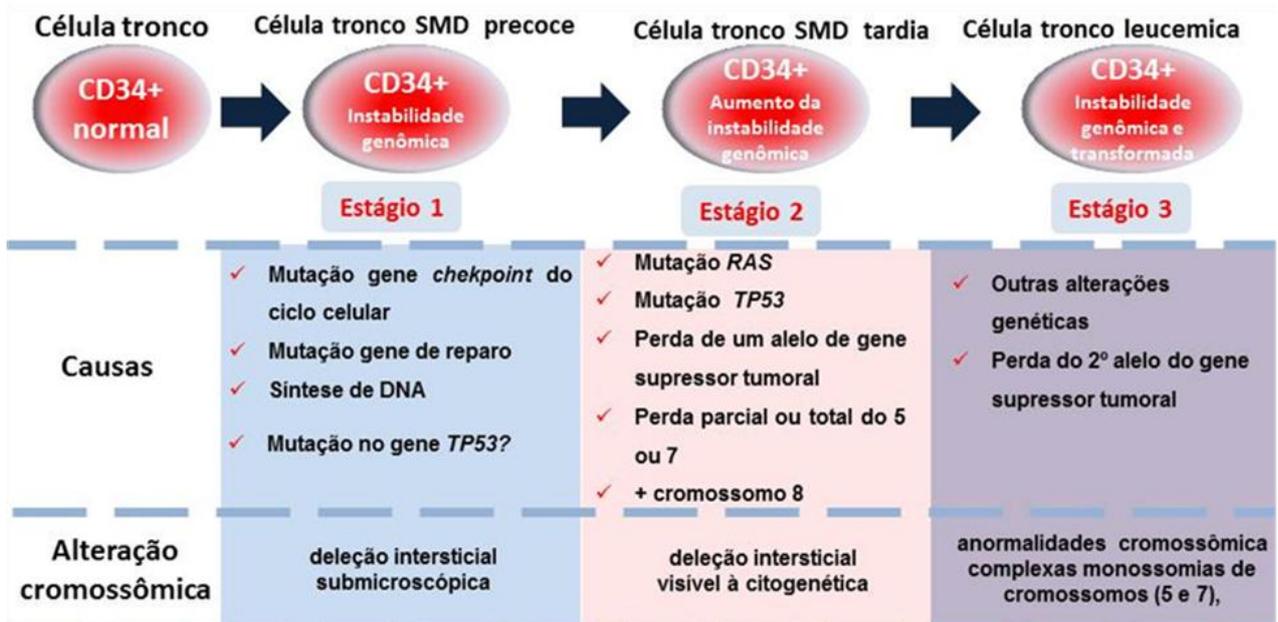
Autor	Estudo	Associação
Keller-Byrne, 1995	Meta-análise	Leucemias
Keller-Byrne, 1995	Meta-análise	Câncer de Próstata
Khuder et al., 1997	Meta-análise	Mieloma Múltiplo
Khuder et al., 1998	Meta-análise	Linfomas Não-Hodgkin
Schuz et al., 2000	Caso-controle	Leucemias e Linf. Não-Hodgkin
Nisse et al., 2001	Caso-controle	Síndrome Mielodisplásica
Roulland, 2009	Caso-controle	Linfomas Não-Hodgkin
Kokouva et al., 2011	Caso-controle	Câncer Hematopoético (Mielodisplasias e Leucemias)

No Ceará, uma pesquisa epidemiológica realizada por Ellery et al. para avaliar a incidência de câncer em agricultores no estado observou que esta população possui maior risco de ser acometida por leucemias (6,35 mais chances), mieloma múltiplo (1,83), linfomas (1,63) entre outros tipos de neoplasias. Esses dados foram obtidos após avaliação de pacientes atendidos em centro de referência para o tratamento do câncer comparando trabalhadores rurais com os demais pacientes atendidos.

A exposição aos xenobióticos ambientais também está associada à ocorrência de deleções nos cromossomos 5 e 7, levando ao desenvolvimento de Síndrome Mielodisplásica (SMD), Leucemia Mielóide Aguda (LMA) e Leucemia Linfóide Aguda (LLA) (West, 2000). Esta observação pode dar suporte à presença de genes importantes nesses cromossomos, cuja perda levaria ao bloqueio da diferenciação ou à proliferação celular descontrolada. Esses estudos são do tipo caso-controle e foram realizados a partir de pacientes acometidos pela neoplasia em que a história ocupacional progressiva era positiva para pesticidas (Kokouva et al., 2011).

Alguns pesquisadores demonstraram os efeitos clastogênicos do herbicida glifosato e do inseticida carbofurano nas células da medula óssea em modelos experimentais. Esses estudos confirmam a ação genotóxica dos pesticidas avaliados na fase inicial da carcinogênese em células hematopoéticas (Giri, 2002; Prasad, 2009). As células hematopoéticas são particularmente sensíveis ao estresse oxidativo e se tornam mais vulneráveis à ação genotóxica dos pesticidas. Esses estudos experimentais comprovam que os pesticidas têm propriedades mutagênicas e podem induzir alterações cromossômicas ou lesões no DNA das células hematopoéticas (Giri et al., 2012). As células tronco da medula óssea, devido à suas propriedades de auto-renovação e diferenciação, são capazes de persistir ao longo da vida. Esse fenômeno aumenta várias vezes o risco de acumular mutações deletérias que possam levar ao desenvolvimento de neoplasias (Naka, 2011).

A instabilidade genômica presente nas neoplasias da medula óssea como, por exemplo, leucemias agudas e síndromes mielodisplásicas, têm sido estudadas pela detecção de alterações cromossômicas (Figura 9).



Adaptado de Veloso., 2011

Legenda: SMD – Síndrome Mielodisplásica,

Figura 9: Ilustração da evolução para transformação leucêmica em células tronco da medula óssea.

A primeira evidência que relacionou a ocorrência de uma neoplasia com translocações entre cromossomos foi a descoberta do cromossomo Philadelphia – t(9;22)(q34;q11) em pacientes com Leucemia Mielóide Crônica. Desde então, têm-se questionado se os pesticidas podem ser responsáveis pelas translocações entre cromossomos observados nos portadores de neoplasias hematopoéticas como Leucemias e Linfomas Não-Hodking (Gauduchon, 2004). Uma das translocações mais encontradas é a t(14;18)(q32;q21), que envolve o sítio do proto-

oncogene *BCL-2*, e é recorrente em 70-90% dos casos de Linfoma Folicular e em 20-30% dos casos de Linfomas Difusos de Grandes Células B (Blair, 2009).

Estudos *in vitro* evidenciam que os pesticidas organofosforados aumentam a expressão do gene *TP53* em células epiteliais mamárias humanas e, pelo efeito genotóxico, podem ser um fator de iniciação para a transformação maligna dessas células (Roy, 2007). Esses tóxicos também são capazes de induzir neoplasia mamária através de instabilidade genômica no *TP53* (Calaf, 2009). Cabello et al. conseguiram induzir mutação no gene *TP53* em células do epitélio mamário de cobaias após exposição aos organofosforados, levando à progressão do câncer de mama. No entanto, ainda não existem estudos consistentes que avaliam o status do gene *TP53* em trabalhadores rurais expostos a pesticidas.

As mutações do gene *TP53* podem ser consideradas como preditores do desenvolvimento de neoplasias e têm sido bastante estudadas nos cânceres primários da medula óssea como LMA, SMD e LLA. As mutações nesse gene podem ser observadas com o uso de técnicas de citogenética molecular - Hibridização *in situ* por fluorescência (FISH). Esta técnica permite avaliar a ausência do gene, a sua amplificação após estresse genotóxico ou aumento do número de cópias do cromossomo (Silva et al., 2012).

1.5 – Vigilância à saúde do trabalhador

A necessidade de conceber e gerar propostas integrais que orientem as intervenções sobre a situação de saúde tem conduzido à proposição de operações e ações de vigilância em saúde. A maioria das intervenções em saúde está voltada para o controle dos danos (morte, doenças e agravos), apresentadas como óbitos, sequelas ou casos. Neste tipo de controle, destaca-se a assistência médico-hospitalar com necessidade de grandes investimentos financeiros e pouca ou nenhuma ação preventiva (Rouquairol e Almeida Filho, 2003).

Para outras doenças e agravos como neoplasias, doenças ocupacionais e intoxicações ambientais, é possível identificar um momento em que há indícios de danos, porém os indivíduos ainda estão assintomáticos. A sua descoberta implica em ações que buscam o diagnóstico precoce por meio de testes de screening, exames periódicos de saúde e consultas médicas. Porém, antes mesmo destas evidências de danos serem detectadas pelas técnicas citadas anteriormente, haveria um momento em que seria possível detectar indícios de exposição, ou mesmo possíveis alterações genéticas (Rouquairol e Almeida Filho, 2003). Os indivíduos e populações sob tais circunstâncias seriam consideradas suspeitos.

Um exemplo comum desta situação é a avaliação rotineira de indivíduos expostos aos derivados do benzeno (frentistas, pintores e mecânicos) com a realização de hemograma seriado para a detecção precoce de leucopenia. No acompanhamento de trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos, esta prática também é realizada. No entanto, o achado de leucopenia pode ser considerado um sinal tardio de lesão nas células precursoras hematopoéticas da medula óssea, sendo muitas vezes o quadro irreversível. A detecção precoce através do estudo de alterações genéticas poderia evitar lesões irreversíveis nas células precursoras hematopoéticas (Pinheiro et al., 2008).

Vários marcadores têm se mostrado úteis para monitorar a exposição humana a agentes mutagênicos e carcinógenos. No Brasil, Pacheco e cols. demonstraram instabilidade

cromossômica induzida por agroquímicos em linfócitos de sangue periférico de trabalhadores rurais na região de Passo Fundo, Rio Grande do Sul. As anormalidades cromossômicas podem ser detectadas pelas técnicas de cultura de curta duração por Banda G (clássica), sendo detectadas aneuploidias, deleções e translocações cromossômicas quando do estudo de células da medula óssea.

Pinheiro et al. demonstraram que a Hibridização *in situ* por fluorescência (FISH), também conhecida como citogenética molecular, tem importante função de complementar a Banda-G na pesquisa de alterações citogenômicas de células da medula óssea (Pinheiro et al., 2009). No entanto, até o momento não há estudos que avaliem os danos das células da medula óssea com estas técnicas em indivíduos expostos a agrotóxicos.

Pesquisadores sugerem que a identificação precoce de alterações genéticas em indivíduos expostos aos carcinógenos é uma importante estratégia de vigilância em saúde com objetivo de diminuir o risco e evitar o desenvolvimento de neoplasias da medula óssea (Battershill, 2006) (Khan et al. 2008). Dessa forma, o estudo das alterações citogenômicas pode ser utilizado como biomarcador do efeito genotóxico na população exposta a agrotóxicos (Norppa, 2004). O emprego destes marcadores poderia causar um grande impacto na prevenção do câncer e na saúde pública de uma forma geral (Roulland, 2009).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a ocorrência de alterações citogenômicas na medula óssea de trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a presença de citopenias ao hemograma;
- Identificar alterações citogenéticas por Banda G em células da medula óssea de trabalhadores rurais expostos;
- Identificar a presença de deleções ou ampliações do gene *TP53* por Hibridação in Situ por Fluorescência - FISH em células da medula óssea de trabalhadores rurais expostos;

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Tipo de Estudo

O estudo realizado foi do tipo epidemiológico, descritivo e transversal realizado nos municípios de Limoeiro do Norte e Potiretama no período entre 2011 e 2012.

3.2 - População do estudo

Foram avaliados trabalhadores rurais expostos ocupacionalmente a agrotóxicos da região da Chapada do Apodi, em Limoeiro do Norte (a 200 km de Fortaleza - CE).

O cálculo da amostra foi baseado em levantamento epidemiológico realizado na região que identificou a ocorrência de 20% de alterações hematológicas no sangue periférico da população estudada (Rigotto et al. 2011). A partir deste levantamento, utilizando-se uma precisão absoluta de 10% e um nível de significância de 5%, calculou-se o grupo amostral de 50 trabalhadores rurais que foram divididos em três grupos:

- Grande empresa = 20 trabalhadores que usam os mesmos tóxicos de maneira uniforme;
- Pequenos produtores = 20 trabalhadores que usam uma grande variedade de agrotóxicos de forma sazonal e sem orientação adequada;
- Agricultura Ecológica = 10 trabalhadores que estavam há mais de 05 anos sem uso de agrotóxicos.

O grupo controle foi obtido a partir de dez doadores saudáveis de medula óssea com idade semelhante ao grupo amostral.

3.3 - Coleta de dados

O grupo amostral foi constituído de 50 trabalhadores rurais que foram caracterizados através de questionário semi-estruturado adaptado de Rigotto 2010 (Apêndice A). Foram obtidas informações relacionadas à idade, escolaridade, hábitos de vida, etilismo, tabagismo,

historia patológica progressiva e neoplasias prévias, tipo de produto e tempo de exposição ao pesticida, uso de medicamentos e exposição à radiação prévia.

Critérios de Inclusão:

- Gênero masculino
- Idade superior a 18 anos e inferior a 60 anos;
- Exposição ocupacional crônica a agrotóxicos;

Critério de exclusão:

- História prévia ou atual de neoplasias e uso de quimioterapia;
- Uso de medicamentos genotóxicos;
- Exposição a radiação terapêutica ou ocupacional.

3.4 - Análise Laboratorial

Todos os agricultores do estudo foram submetidos a:

- Hemograma automatizado;
- Citogenética clássica por Banda-G de aspirado medular.
- FISH para pesquisa de monossomia ou amplificação do *TP53*.

3.5 - Material e Método

3.5.1 - Citogenética Clássica

A citogenética clássica por banda G foi realizada da forma habitual segundo Pinheiro et al. 2009, isto é, a medula óssea (M.O) foi colhida em heparina e de forma estéril foi dividida em dois frascos contendo 7 mL de meio RPMI (pH 7,0), 3 mL de soro fetal bovino e 100µl de L-glutamina. Este material foi cultivado por 24 horas em estufa de CO₂ a 37°C. Uma

hora antes do término da cultura foram adicionados 50 uL de colchicina (Colcemid[®]), por 30 minutos. Em seguida, o material foi centrifugado e ressuspenso em solução hipotônica de KCL 0,075 M e fixado em solução de ácido acético e metanol (3:1), por 4 vezes. Para confecção das lâminas para análise, o material foi gotejado em lâminas de microscopia e secado ao ar. As bandas foram feitas pela técnica de tripsina-Giemsa (GTG), sendo analisadas pelo menos 20 metáfases e os cromossomos classificados de acordo com o sistema internacional de nomenclatura citogenética humana (ISCN 2009). As metáfases foram capturadas em sistema computadorizado (Cytovision-USA Inc) com software para cariotipagem, e o cariótipo digitalizado e impresso em impressora a laser.

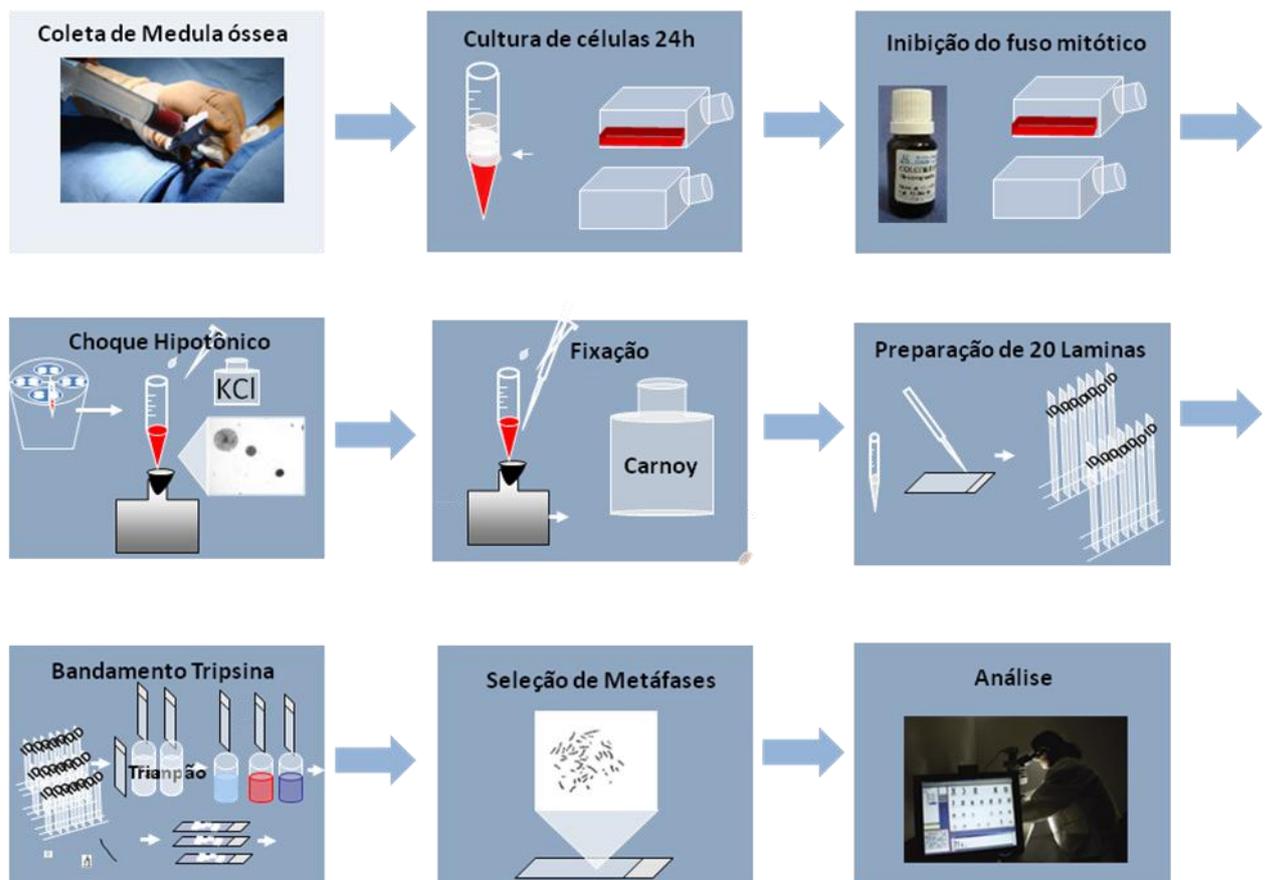


Figura 10 – Sequência esquemática da citogenética por Banda G de células da medula óssea.

3.5.2 - Hibridação in situ por fluorescência (FISH)

Para a FISH foram utilizadas sondas *TP53* (LPH017-S) para região p13 do cromossomo 17 seguindo-se as instruções do fabricante. As lâminas foram preparadas 24h antes para o envelhecimento. O material fixado em solução de Carnoy e mantido a 4°C foi retirado do congelador e deixado em temperatura ambiente por três minutos e posteriormente gotejado nas lâminas de vidro com pipeta de ponta fina e secado ao ar ambiente. A celularidade do material foi verificada em microscópio óptico com filtro verde, tomando-se o cuidado com a concentração da amostra para que as células não formassem grumos, o que prejudicaria a análise dos sinais fluorescentes. Para toda reação da FISH foi realizado um controle normal proveniente de doadores de medula, após consentimento informado, cujas amostras foram armazenadas a 4°C e cujos cariótipos, por banda G, fossem normais. Estes mesmos controles foram utilizados para a definição de valores de normalidade. Estes foram calculados a partir da soma das 200 células contadas por cada um dos dois observadores, e calculada a média de cada controle. A soma desta média com dois desvios padrão determinou os valores de normalidade. A análise das lâminas foi feita em microscópio de epifluorescência da marca OLYMPUS BX51 – FL-II com os seguintes filtros: azul, vermelho, verde, violeta Dup, Trip, Em&Esp. Este microscópio é acoplado a um sistema de captura de imagem (CYTOVISION). Um mínimo de 200 células por amostra foram avaliadas por dois investigadores independentes. Na presença de discrepância, os resultados foram analisados, combinados e calculada a média. Apenas os sinais não sobrepostos com núcleos aparentemente intactos foram contados. Foram aplicados os critérios rigorosos de avaliação de sinal da FISH para evitar superestimação da hiperdiploidia, o que pode resultar de fatores celulares e técnica (Eastmond, 1995). Aneuploidia foi definido como a presença de ≥ 3 sinais verdes (centrómero de cromossoma 17) para a célula. A amplificação foi definida por ≥ 3 sinais vermelhos (gene *TP53*) e dois sinais verdes (centrómero do cromossomo 17) cópias /

celula. Deleção do *TP53* foi definido por um sinal vermelho (gene *TP53*) e dois sinais verdes (centrômero do cromossomo 17) cópias/ célula. O ponto de corte para o reconhecimento de um caso afetado por trissomia e monossomia foi de 3% e 10%, respectivamente (Cuneo, 1997). O critério para a amplificação do gene *TP53* foi de 5%.

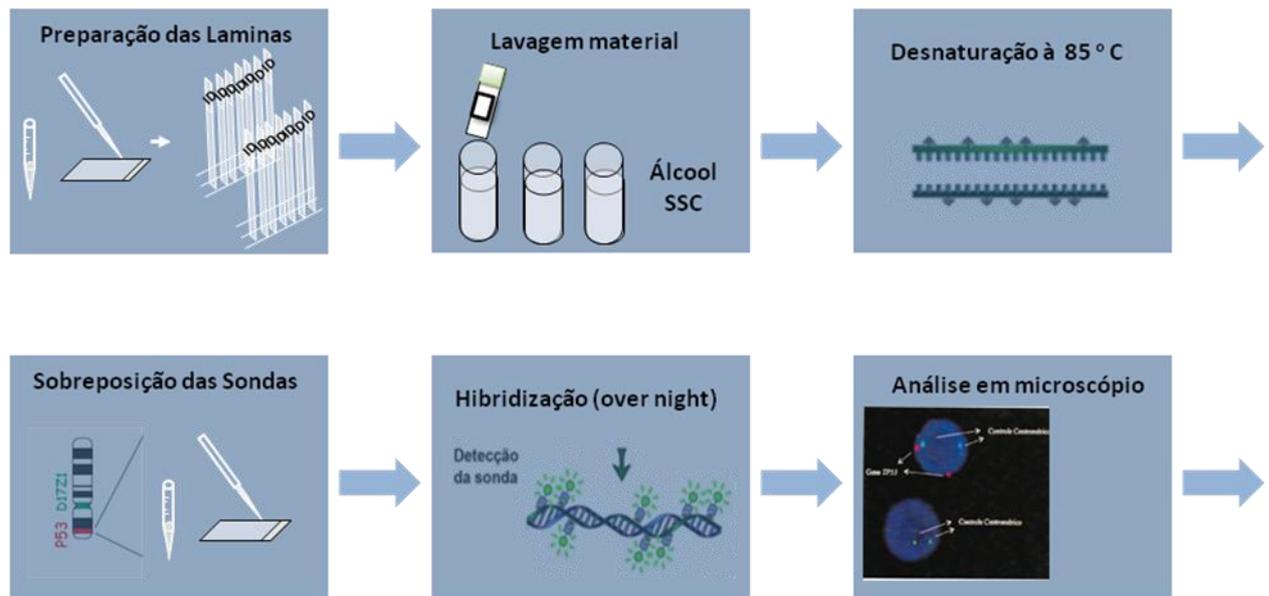


Figura 11 – Sequência esquemática do processo de Hibridização in situ por Fluorescência (FISH) para o gene *TP53* de material obtido de cultura de células da medula óssea.

3.6 - Análise Estatística

A organização dos dados foi feita através da análise dos questionários, realizada no programa Excel e plotados sob a forma de percentual em gráficos e tabelas.

As variáveis referentes aos indivíduos estudados foram comparadas ao grupo controle e avaliadas pelo teste do qui quadrado, sendo consideradas significativas as diferenças com $p < 0,05$.

3.7 - Considerações Éticas

O estudo obteve aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Walter Cantídio da Universidade Federal do Ceará, através do Protocolo CEP N° 016.02.11 (EM ANEXO), tendo sido cumpridas todas as exigências da resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde.

Após análise dos resultados, os sujeitos nos quais foram observados alguma alteração laboratorial foram convidados para acompanhamento ambulatorial e suporte psicológico no Serviço de Hematologia do Hospital Universitário Walter Cantídio da Universidade Federal Ceará.

4 RESULTADOS

4.1 - Caracterização da população estudada

Fizeram parte deste estudo 50 trabalhadores rurais moradores de comunidades dos municípios de Limoeiro do Norte e Potiretama - CE. Após aplicação dos critérios de inclusão e exclusão, apenas 43 puderam ser avaliados quanto à exposição aos agrotóxicos.

Dos 43 trabalhadores avaliados, 23% representava o grupo que trabalha apenas com agricultura familiar, 18% pertencia ao grupo com mais de cinco anos sem exposição a agrotóxicos, que atualmente praticam agricultura ecológica e 58% pertencia ao grupo de trabalhadores do agronegócio da banana (Figura 12).

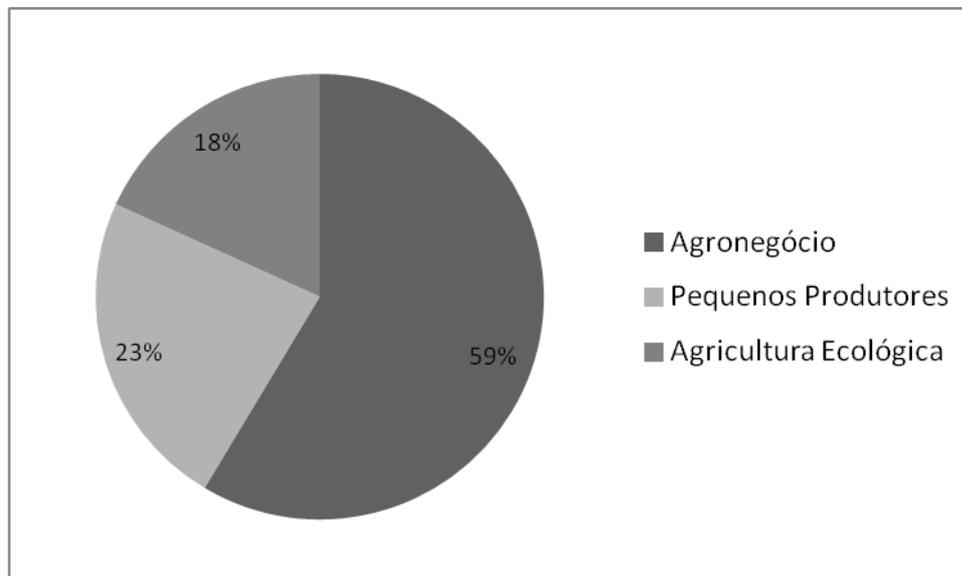


Figura 12 – Caracterização dos trabalhadores rurais quanto ao grupo de exposição aos agrotóxicos.

Em relação à idade dos trabalhadores, observamos que a média de idade do grupo estudado foi de 41 anos (variando de 23 a 56), semelhante à média de idade do grupo controle que foi de 42 anos.

Quanto aos hábitos de tabagismo e consumo de álcool, observamos que 9 (21%) dos trabalhadores fumavam diariamente há mais de um ano e apenas 2 (4,6%) tinham o hábito de consumir álcool diariamente (Tabela 2). Outros 9 (21%) bebiam apenas nos finais de semana, sendo que o tipo de bebida mais prevalente foi a cerveja.

Tabela 2 - Características dos trabalhadores rurais estudados.

Características	Expostos	Controle	p valor
Idade Média	41,6 ± 10,6	42,8 ± 10,1	p>0,05
Tempo de Exposição em anos	10,2	Nenhum	
Variação (anos)	(2 – 30)		
Fumantes (%)	9 (21)	0 (0)	
Etilistas N (%)	2 (4,6)	0 (0)	
Total sujeitos	43 (100)	10 (100)	

* Teste de Fisher

A maioria dos trabalhadores foi exposta a produtos químicos por uma média de 10,4 anos (variando de 2 a 30), seja trabalhando no preparo, na mistura ou na pulverização de pesticidas, sendo que mais da metade deles de forma diária e constante (Tabela 3).

Tabela 3 – Tempo total de exposição em anos dos trabalhadores rurais estudados. Classificado de acordo com Ramos, 2009.

Tempo de Exposição (anos)	n	%
1 a 5	5	14
6 a 10	4	11
11 a 15	6	17
16 a 20	11	31
> 25	9	25
Total	35	100

Quando questionados sobre o uso de agrotóxicos na agricultura familiar, os trabalhadores responderam prontamente os nomes dos produtos mais utilizados que foram enumerados na Tabela 4.

Tabela 4 - Lista dos pesticidas mais citados pelos trabalhadores rurais de acordo com a frequência de utilização na agricultura familiar.

Pesticida	Nome	% utilizada	Classe Química
Inseticidas	Metamidofós	64%	Organofosforado
	Paration	92%	Organofosforado
	Monocrotofós	68%	Organofosforado
Herbicidas	Glifosato	32%	Glicina Substituída
	Propanil	80%	Anilida
	2,4 Diclorofenoxiacético	76%	Clorofenoxiacético

Em relação ao uso de equipamentos de proteção individual apenas 23% dos trabalhadores afirmaram ter o cuidado de utilizar a proteção recomendada durante o preparo e aplicação de produtos químicos. Dentre os demais, 21% afirmaram não utilizar nenhum equipamento de proteção e o restante utilizava de modo esporádico apenas algum tipo de proteção (Tabela 5).

Tabela 5 - Percentual de uso de equipamentos de proteção individual pelos trabalhadores rurais.

Uso de Equipamento de Proteção Individual	%
Nenhum EPI	21
Bota + luva	28
Bota + luva + macacão	7
Bota + Luva + mascara+ óculos + macacão	23

4.2 – Avaliação Hematológica

Foram coletadas amostras de sangue periférico e de medula óssea de todos os 43 trabalhadores rurais estudados para a realização de hemograma, citogenética por Banda G e molecular para o gene *TP53*. Todas as amostras analisadas tiveram resultado de hemograma normal, sendo que não foi observado nenhum caso de citopenia (dados não apresentados).

4.3 – Citogenética por Banda G

Após a cultura de células hematopoéticas para citogenética, foi realizada análise cromossômica em 43 casos. Em 13 (30%) casos não houve crescimento celular suficiente e não foram encontradas metáfases para avaliação da estrutura dos cromossomos.

Entre os casos com resultados de citogenética, 63% revelaram ausência de anormalidades com cariótipo normal (46,XY[20]). Foram detectadas alterações cromossômicas nas células de 11 (25%) trabalhadores rurais (Tabela 6).

Os casos que chamaram mais atenção foram as alterações estruturais relacionadas aos cromossomos 4, 5, 7 e 11. Foram encontrados 2 casos com deleção do braço longo do cromossomo 11 (Figuras 13 e 16) e 2 casos com deleção do braço longo do cromossomo 7 (Figuras 14 e 15). Entre os casos com deleção no cromossomo 7, um deles também apresentava deleção no braço longo do cromossomo 5 (Figura 14) e o outro apresentava um material adicional no cromossomo 4 (Figura 15). O outro caso encontrado apresentou um material adicional no cromossomo 4 (Figura 17).

A maioria das alterações encontradas foram relacionadas a aneuploidias (6/11). Aneuploidia é definida como um número de cromossomos diferente de 46 (Figura 18).

Tabela 6: Resultados da Citogenética e FISH para o gene *TP53*

Caso	Idade	Citogenética	FISH para <i>TP53</i>
1	56	46,XY[25]	Normal
2	39	Sem metáfase	Normal
3	38	Sem metáfase	Normal
4	30	46,XY[15]	Sem material
5	41	Sem metáfase	Tetrassomia
6	23	46,XY[26]	Normal
7	27	46,XY[20]	Normal
8	39	46,XY,del(5)(q31),del(7)(q32)[5]/46,XY[18]	Normal
9	29	46,XY[11]	Normal
10	32	Sem metáfase	Tetrassomia
11	28	46,XY[15]	Normal
12	41	46,XY[10]	Normal
13	40	46,XY[20]	Deleção
14	50	Sem metáfase	Amplificação
15	42	Sem metáfase	Tetrassomia
16	30	Sem metáfase	Amplificação
17	38	20~30,+1,+14,+16,+18,+21,+22[5]/45,XY[5]	Sem material
18	50	46,XY[7]	Sem material
19	42	46~47,XY,add(4)(p16),del(7)(q32),+mar[7]/46,XY[13]	Sem material
20	44	46,XY[7]	Sem material
21	55	46, XY [4]	Deleção
22	34	46,XY[7]	Sem material
23	45	44,XY,-20,-21[8]/46,XY[2]	Trissomia
24	36	Sem metáfase	Amplificação
25	39	46,XY,del(11)(q23)[4]/46,XY[16]	Normal
26	61	Sem metáfase	Normal
27	49	Sem metáfase	Monossomia
28	42	18~35,XY,-4,-5,-8,-9,-11,-16,-17,-19,-20,-21,-22,[8]/46,XY[2]	Sem material
29	30	46,XY,add(4)(?q35)[3]/46,XY[16]	Sem material
30	23	Sem metáfase	Normal
31	24	46,XY[10]	Sem material
32	42	17~35,XY,-2,-4,-8,-9,-12,-14,-15,-16,-17,-18,-19,-20,-22[cp8]/46,XY[10]	Normal
33	50	25,+4[3]/33,+1,+2,+5,+10,+16,+17,+18,+19,+21,+22[3]/43.-10,-16,-Y[3]	Normal
34	47	46, XY[10]	Sem material
35	49	46,XY[20]	Normal
37	48	Sem metáfase	Trissomia
37	48	32~45,-1,-18,-7,-14,-16[cp9]	Deleção
38	52	46,XY[17]	Normal
39	34	46,XY[7]	Normal
40	49	Sem metáfase	Normal
41	32	46,XY[10]	Sem material
42	60	46,XY[5]	Deleção
43	56	46,XY,del(11)(q23)[3]/46,XY[17]	Sem material

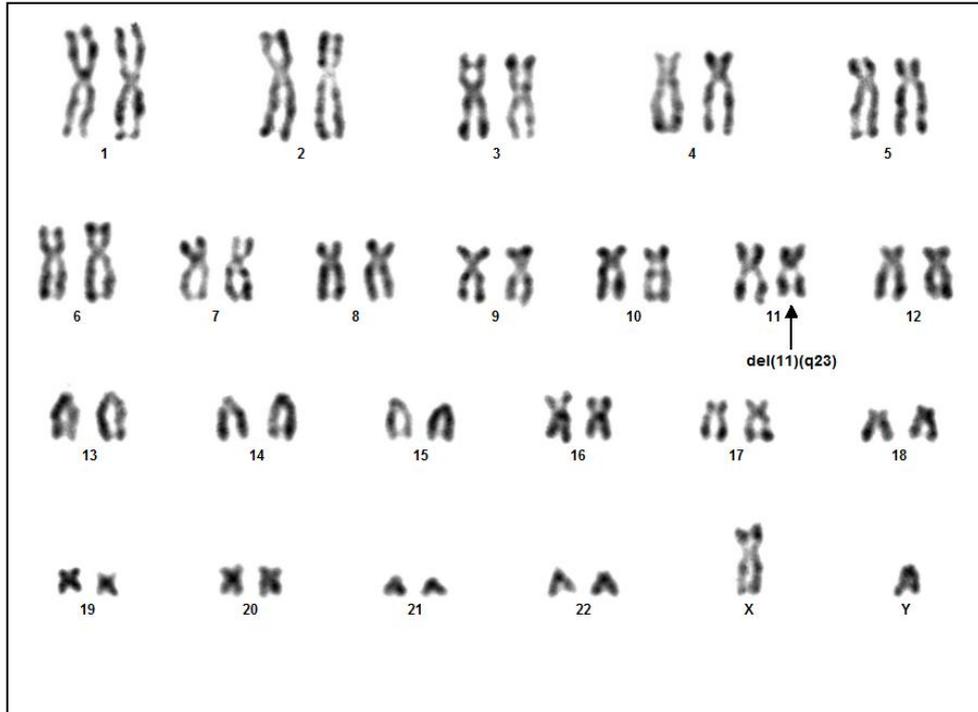


Figura 13: Caso 25 revela deleção do braço longo do cromossomo 11.

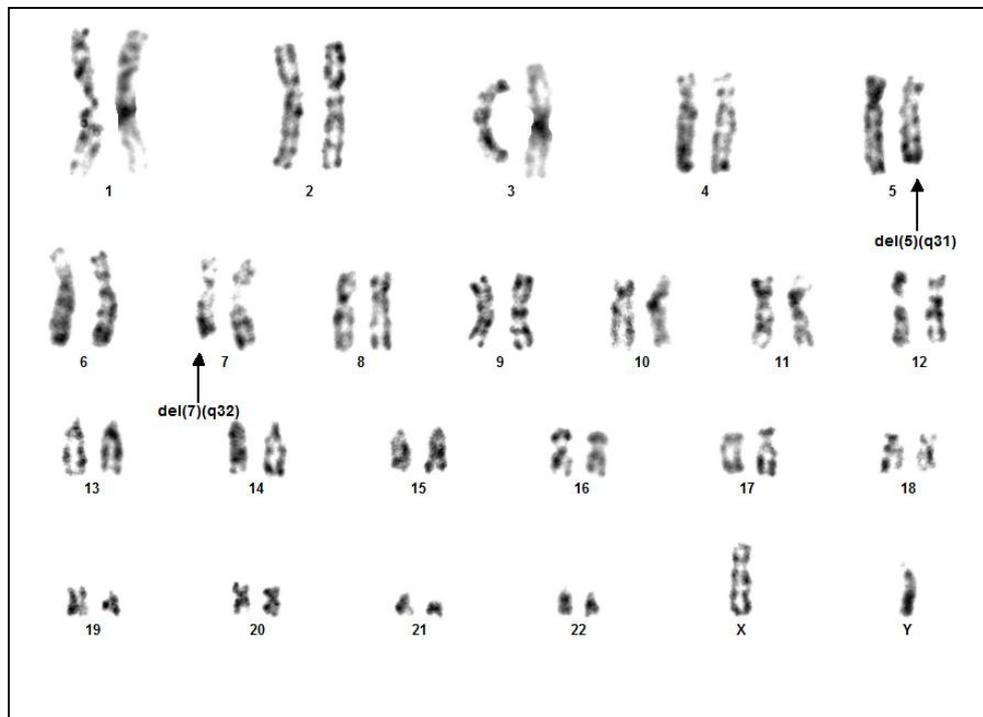


Figura 14: Caso 8 revela deleção do braço longo do cromossomo 5 e deleção do braço longo do cromossomo 7.

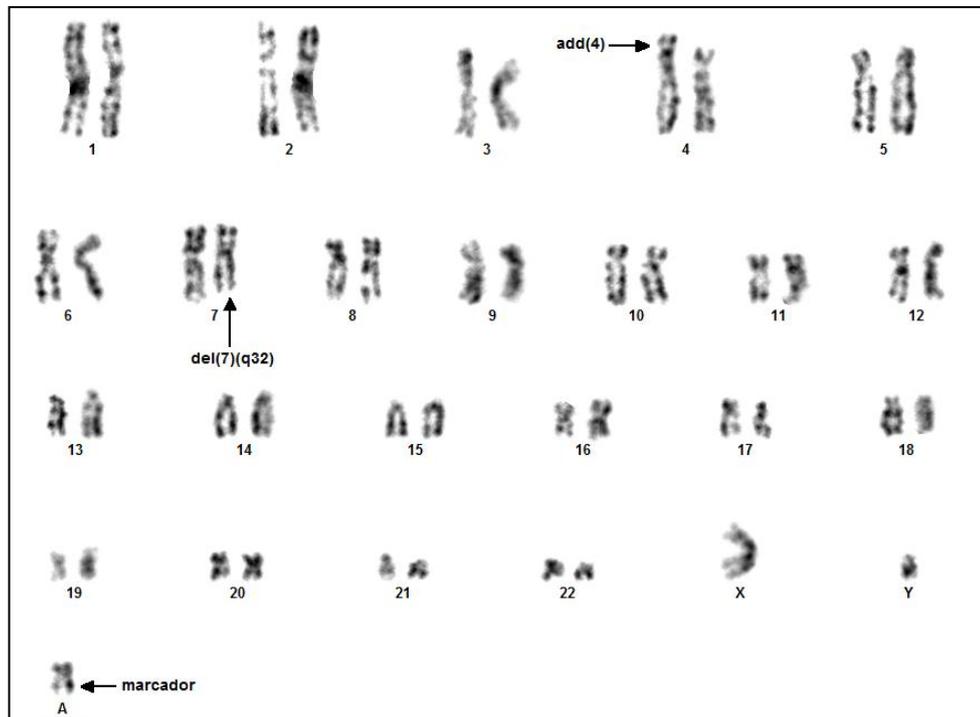


Figura 15: Caso 19 revela deleção do braço longo do cromossomo 7 e material adicional no cromossomo 4, além da presença de um cromossomo marcador.

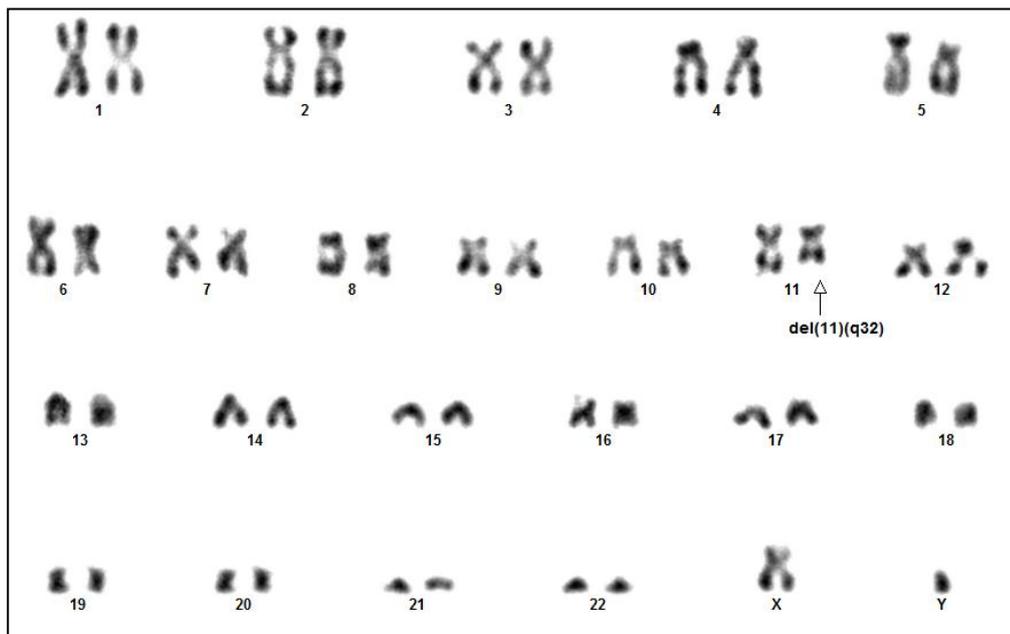


Figura 16: Caso 43 revela deleção do braço longo do cromossomo 11.

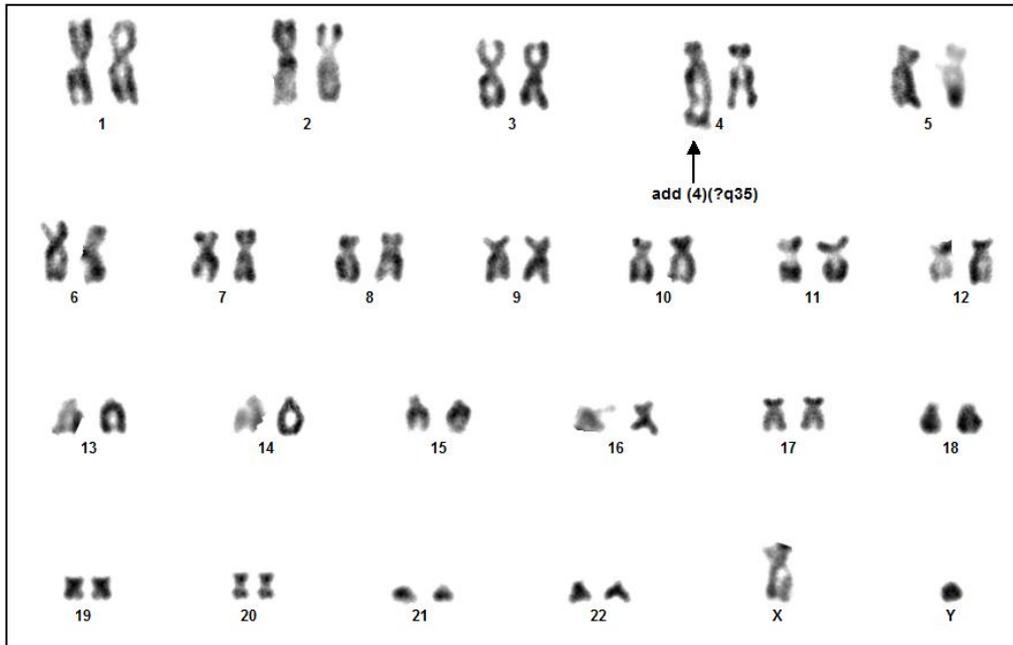


Figura 17: Caso 29 revela material adicional no cromossomo 4.

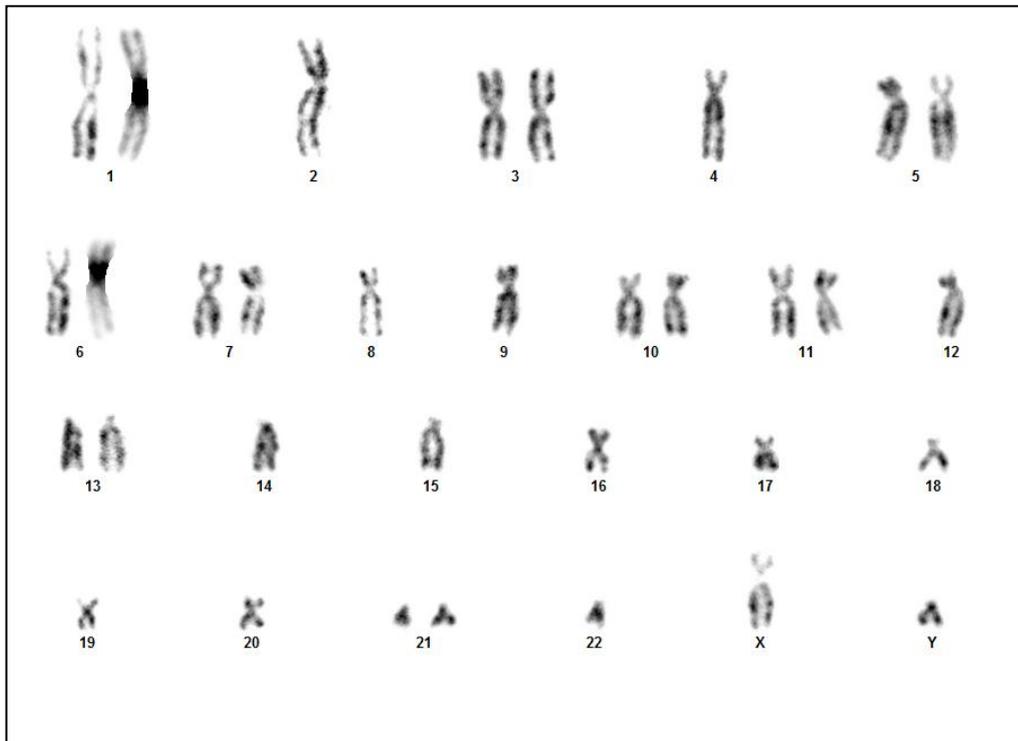


Figura 18: Caso 42 revela hipodiploidia.

4.4 – Avaliação do gene *TP53* por FISH

Foram realizadas análises do gene *TP53* por FISH de 31 amostras da medula óssea dos trabalhadores rurais. Foi observado o número de cópias do gene *TP53* e do cromossomo 17.

Entre os casos avaliados, a maioria (58%) apresentava o padrão normal de cópias para o gene *TP53* e para o cromossomo 17. Entre os 31 sujeitos, em 13 casos o número de cópias do cromossomo 17 estava diferente do número de cópias do gene *TP53* nos núcleos das células em interfase.

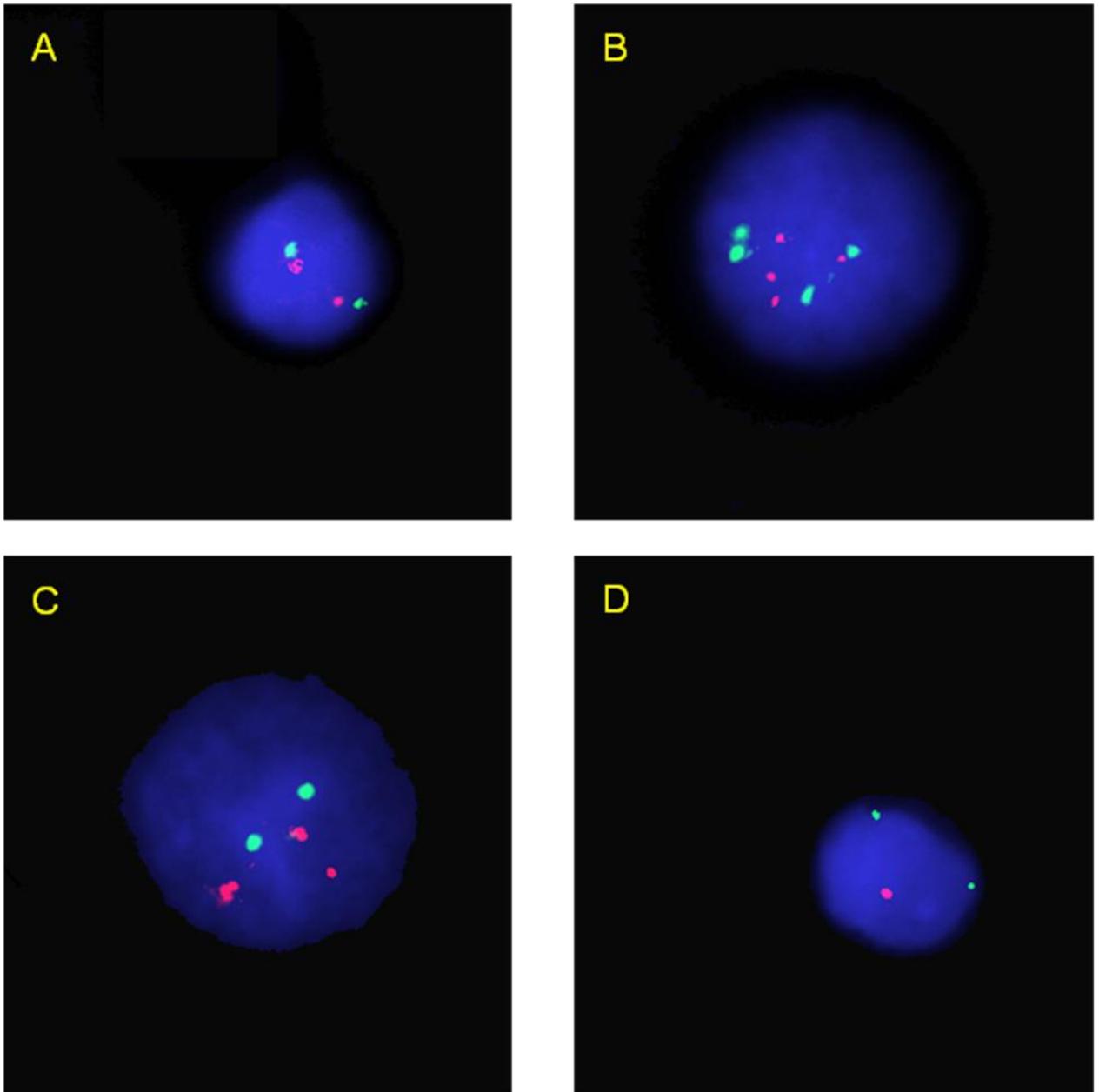
Nós observamos deleção do *TP53* em 4/31 (casos 13, 21, 37 e 42) (Tabela 6) e amplificação em 3/31 (casos 14, 16 e 24) (Tabela 6). As outras alterações encontradas foram relacionadas a aneuploidias (6/13) (Tabela 6). A maioria desses resultados ocorreu naqueles casos em que não foi possível avaliar a estrutura dos cromossomos nas metáfases (Tabela 6). Entre as alterações numéricas dos cromossomos foram observadas tetrassomia em 3 (9,6%) casos, trissomia em 2 (6,4%) casos e monossomia do cromossomo 17 em 1 (3,2%) caso (Tabela 7) (Figura 19).

Tabela 7: Frequência de deleções, aneuploidias e amplificação do gene *TP53*.

Tipo de Alteração	Grupo Exposto	Grupo Controle
Deleção N (%)	4 (12,9)	0 (0)
Monossomia N (%)	1 (3,2)	0 (0)
Trissomia N (%)	2 (6,4)	0 (0)
Tetrassomia N (%)	3 (9,6)	0 (0)
Amplificação N (%)	3 (9,6)	0 (0)

Não foram encontradas alterações para o gene *TP53* por FISH no grupo controle (doadores saudáveis de medula óssea) (Tabela 7).

Figura 19: Fotomicrografia de microscópio de fluorescência do gene *TP53* e do centrômero do cromossomo 17.



Os sinais vermelhos representam os sítios de hibridização da sonda para o gene *TP53*. Os sinais verdes representam os sítios de hibridização para o centrômero do cromossomo 17.

(A) Controle mostrando o padrão normal de hibridização: um sinal vermelho para cada cromossomo 17 e um sinal verde para cada *TP53* por núcleo. (B) Aneuploidia: observamos mais de dois sinais tanto para o cromossomo 17 como para o gene *TP53* por núcleo. (C) Amplificação do gene *TP53*: observamos dois sinais para o cromossomo 17 e três sinais para o gene *TP53* por núcleo. (D) Deleção do gene *TP53*: observamos apenas um sinal para o gene *TP53* e dois sinais para o cromossomo 17 por núcleo.

5 DISCUSSÃO

Após extensa revisão bibliográfica acreditamos que este é o primeiro trabalho que detectou anormalidades cromossômicas em células da medula óssea de indivíduos expostos a pesticidas. Foram avaliados os cromossomos de um pool de células da medula óssea contendo células tronco hematopoéticas (CTH) obtidas a partir de aspirado da medula óssea que, ao contrário das culturas de curto prazo de linfócitos, provavelmente podem explicar os nossos resultados.

As células-tronco hematopoéticas (CTH) têm a capacidade de auto-renovação e podem persistir por toda a vida. Esse fenômeno aumenta o risco de acumular mutações deletérias adquiridas durante a sua existência. Além disso, as lesões não reparadas em CTH podem ser passadas e amplificadas nas células-filhas durante o processo de auto-renovação e diferenciação em situações que demandem aumento da proliferação celular (Naka, 2011). O material obtido em aspirado da medula óssea é representado por CTH e sua linhagem progenitora. A CTH é também particularmente sensível ao stress oxidativo e o seu elevado índice proliferativo a torna mais vulnerável aos pesticidas (Mena et al., 2009). Alguns estudos experimentais revelaram que os pesticidas têm propriedades mutagênicas que induzem alterações cromossômicas ou danos no DNA de células da medula óssea expostas a esses produtos (Giri et al., 2002).

Paiva et al. também estudaram as anomalias cromossômicas de duas comunidades rurais do Ceará (Brasil), mas não detectaram alterações. Utilizando o Ensaio Cometa eles foram capazes de demonstrar que a quebra de DNA foi mais frequente em trabalhadores rurais expostos a pesticidas do que no grupo controle. Uma questão importante que deve ser levantada é o fato de que eles foram capazes de demonstrar anormalidades no DNA pelo ensaio cometa, mas não anomalias citogenéticas nos cromossomos de linfócitos. Acreditamos que a ausência de anomalias cromossômicas neste estudo foi devido à utilização de culturas

de curto prazo de linfócitos. Esta técnica utiliza amostras de sangue obtidas por punção venosa para obtenção de linfócitos que não são células apropriadas para detectar anormalidades cromossômicas adquiridas ao longo do tempo. Vários outros estudos realizados com amostras de linfócitos provenientes de sangue periférico também não detectaram anormalidades cromossômicas nestas culturas (Hoyos, 1996; Gregorio, 2000; Lucero, 2000; Holland, 2002; Pastor, 2002). Bhalli et al. estudaram os efeitos genotóxicos de agrotóxicos em trabalhadores rurais do Paquistão (um país em desenvolvimento) e avaliaram o material genético através da citogenética e do número de micronúcleos em linfócitos binucleados. Eles relataram um aumento do dano ao DNA, mas não foram capazes de descrever o tipo de anormalidade citogenética e os cromossomos que foram envolvidos neste processo.

No presente trabalho, onze indivíduos expostos a pesticidas apresentaram anormalidades cromossômicas. Estas anomalias podem ser divididos em dois subtipos: alterações numéricas e estruturais. Foram observados sete casos de aneuploidias, uma alteração cromossômica do tipo numérica que pode ocorrer devido a um cromossomo extra ou ausente (Eastmond et al., 1990). Algumas células cancerígenas apresentam número anormal de cromossomos que podem surgir em decorrência de problemas ocorridos durante a divisão celular. Durante o processo de divisão, devido à erros enzimáticos ou uma elevada instabilidade genômica, os cromossomos não irão se separar adequadamente entre as duas células e irão formar células aneuplóides (Gordon et al., 2012). Essas alterações cromossômicas estão bastante relacionadas ao prognóstico das doenças malignas. Por exemplo, em pacientes com diagnóstico de mieloma múltiplo cujas células malignas apresentam hipodiploidia (menos de 46 cromossomos) o prognóstico se torna desfavorável, sendo um achado relativamente comum (Swerdlow, 2008). Entre os casos encontrados nesse

estudo foram observados trabalhadores rurais com 20 ~ 30, 32, 33 cromossomos, casos típicos de aneuploidia.

Uma observação interessante é o fato de que o pesticida glifosato, um dos mais utilizados pelos trabalhadores desse estudo, é capaz de alterar o ciclo celular em modelos experimentais (Bellé et al., 2002). Nesses animais, o glifosato inibe a síntese do DNA que ocorre na fase S do ciclo celular e ainda provoca o retardo da fase M pela ativação da CDK1/Ciclina B (Marc et al., 2004). Agindo desta forma, o pesticida pode retardar o tempo de proliferação celular das culturas de células da medula óssea desses trabalhadores. Este retardo impediria o bloqueio do ciclo celular na fase de metáfase induzido pela colchicina, etapa fundamental para a visualização da morfologia dos cromossomos na citogenética. Esta ação do pesticida poderia explicar o elevado número de casos (30%) em que não houve o crescimento celular esperado para a visualização de metáfases.

Os resultados de máxima importância foram a detecção de anormalidades do tipo estrutural relacionadas aos cromossomos 4, 5, 7 e 11 em quatro trabalhadores rurais. Foram encontradas deleções do braço longo dos cromossomas 5, 7 e 11 nas células da medula óssea desses indivíduos. Esta descoberta é particularmente importante pelo fato de estas alterações serem descritas com recorrência em doenças da medula óssea como síndromes mielodisplásicas (SMD) e leucemias mielóides agudas (LMA) (Frohling, 2008). Anormalidades clonais são observados em ~ 50% dos casos de SMD, sendo que a anormalidade mais comum é a deleção do braço longo do cromossomo 5. As anormalidades dos cromossomas 5 e 7, são detectadas em LMA secundária à quimioterapia e são considerados de prognóstico sombrio (Swerdlow, 2008).

A deleção do braço longo do cromossomo 11, região onde se localiza o gene *MLL*, além de ser descrita com recorrência em pacientes com SMD e LMA também é encontrada

em vários outros tipos de câncer, bem como a deleção do braço curto do cromossomo 17, onde está localizado o gene *TP53*, o guardião do genoma.

Deleções extensas de cromossomos que afetam múltiplos genes tornam difícil a identificação do gene que contribui para o desenvolvimento do câncer. A abordagem clássica para a identificação de um gene supressor tumoral compara vários tumores com uma deleção cromossômica específica para determinar a região genômica que foi perdida em todos os casos. Os genes candidatos desta região são, então, selecionados para promover deleções, mutações, ou modificações epigenéticas que inativam os alelos restantes. Através dessa estratégia foi possível a identificação de genes supressores tumorais importantes, tais como *TP53* (17p13.1), *APC* (5q21-q22), *ATM* (11q22-q23) e *NF1* (17q11.2) (Frohling, 2008).

O ganho de material genômico frequentemente surge após disjunção cromossômica ou translocações desequilibradas, que causam trissomias cromossômicas totais ou parciais, ou após eventos que afetam a amplificação de segmentos de DNA de tamanho diferente. Vários exemplos de ganhos genômicos em larga escala estão associados com tipos específicos de câncer. (Frohling, 2008).

Desta forma, o aparecimento de material adicional no cromossomo 4 encontrado em 2 trabalhadores rurais pode refletir o resultado de uma translocação desequilibrada ou amplificação de segmentos do DNA, cujo resultado é a alteração funcional dos genes envolvidos naquela região. Uma vez que tais aberrações envolvem múltiplos genes, a identificação do alvo funcionalmente relevante se torna tarefa mais difícil.

As anomalias citogenéticas são um atributo característico de células neoplásicas. Até o presente momento, as aberrações cromossômicas clonais foram encontrados nos principais tipos de câncer em mais de 54.000 pacientes (Frohling, 2008). A classificação de tumores da Organização Mundial da Saúde (OMS) reconhece um número crescente dessas alterações genéticas e as utiliza para definir entidades específicas dessas doenças. Muitas dessas

aberrações se revelaram marcadores prognósticos e preditivos em neoplasias hematológicas e certos tipos de tumores sólidos (Swerdlow, 2008). Além disso, a caracterização molecular das anormalidades citogenéticas forneceu uma melhor compreensão sobre os mecanismos da carcinogênese à medida em que permite o conhecimento da função dos genes envolvidos nessas alterações cromossômicas. Em casos particulares, esse discernimento levou a descoberta de um tratamento que tem como alvo uma anomalia genética específica.

Apesar de todas as anormalidades cromossômicas aqui detectadas serem achados recorrentes em doenças da medula óssea como Síndrome Mielodisplásica, Leucemia Mielóide Aguda e Mieloma Múltiplo, esses achados não representam câncer. O câncer é uma doença com várias etapas em que a anormalidade cromossômica pode ser o primeiro passo. Os passos adicionais são necessários para o desenvolvimento da neoplasia, como mutações em genes supressores tumorais, amplificação de oncogenes e modificações epigenéticas (Aparício, 2013).

De acordo com Lubs e Samuelson a idade está diretamente relacionada com o aparecimento de alterações cromossômicas. Esses pesquisadores demonstraram que a partir dos 60 anos ocorre uma elevação progressiva da incidência de alterações cromossômicas espontâneas. Como a idade dos indivíduos avaliados no presente estudo variou de 23 a 56 anos, podemos assegurar que as alterações cromossômicas encontradas não sofrem interferência da idade.

Os critérios de inclusão e exclusão utilizados no presente estudo foram extremamente rígidos no tocante a evitar o máximo de interferências de agente externos potencialmente capazes de levar à ocorrência de mutações. No entanto, devido à elevada prevalência entre a população de trabalhadores rurais, indivíduos com hábitos como o tabagismo e o etilismo não puderam ser excluídos do estudo.

Em relação ao hábito de fumar, dois casos (32 e 33) apresentaram anormalidades cromossômicas que também podem estar relacionados ao tabagismo e um caso (25) apresentou alteração que também pode estar relacionada ao etilismo. Estes três casos são de trabalhadores rurais cronicamente expostos a pesticidas, mas devemos lembrar que o câncer é considerado uma doença multifatorial e que a exposição ao álcool e ao fumo aumentam bastante o risco de desenvolver neoplasias (Sailaja et al., 2006). Dessa forma, todos esses trabalhadores rurais devem evitar o álcool, o tabagismo e a exposição a pesticidas a partir de agora, devido ao alto risco de desenvolver doenças malignas.

Nós também encontramos anormalidades relacionadas ao gene *TP53*, também conhecido como guardião do genoma. Vários estudos tem demonstrado que as alterações do gene *TP53* por FISH são observadas em muitos tipos de câncer (Massoner, 2004; Krishnamurti, 2009; Han, 2012). Foram examinados os números de cópias do gene *TP53* e do cromossomo 17 nesses indivíduos expostos utilizando usando sondas fluorescentes que se ligam diretamente á região do cromossomo por hibridização. Essa técnica permite a observação de um gene específico mesmo naquelas células que não atingiram a fase de metáfase, tornando-se um método mais sensível de citogenética molecular. Identificamos deleção do gene *TP53* em 4 trabalhadores rurais. A deleção do gene *TP53* é considerada uma alteração menos frequente, mas quando encontrada, representa um fator adverso importante porque pode impedir a ação dos mecanismos de reparo do DNA (Frohling et al., 2008).

Polissomias do cromossomo 17 foram encontrados em 5/31 do grupo exposto como trissomia (7,4%) e tetrassomia (11,1%). Estes ganhos genômicos geralmente surgem de disjunção cromossômica que provoca trissomias cromossômicas completas ou parciais (Frohling et al., 2008). Anormalidades numéricas ocorrem em um grande número de neoplasias da linhagem mieloide, sendo que a trissomia do cromossomo 8 pode ser encontrada na maioria dos casos (Jenkins et al., 1992).

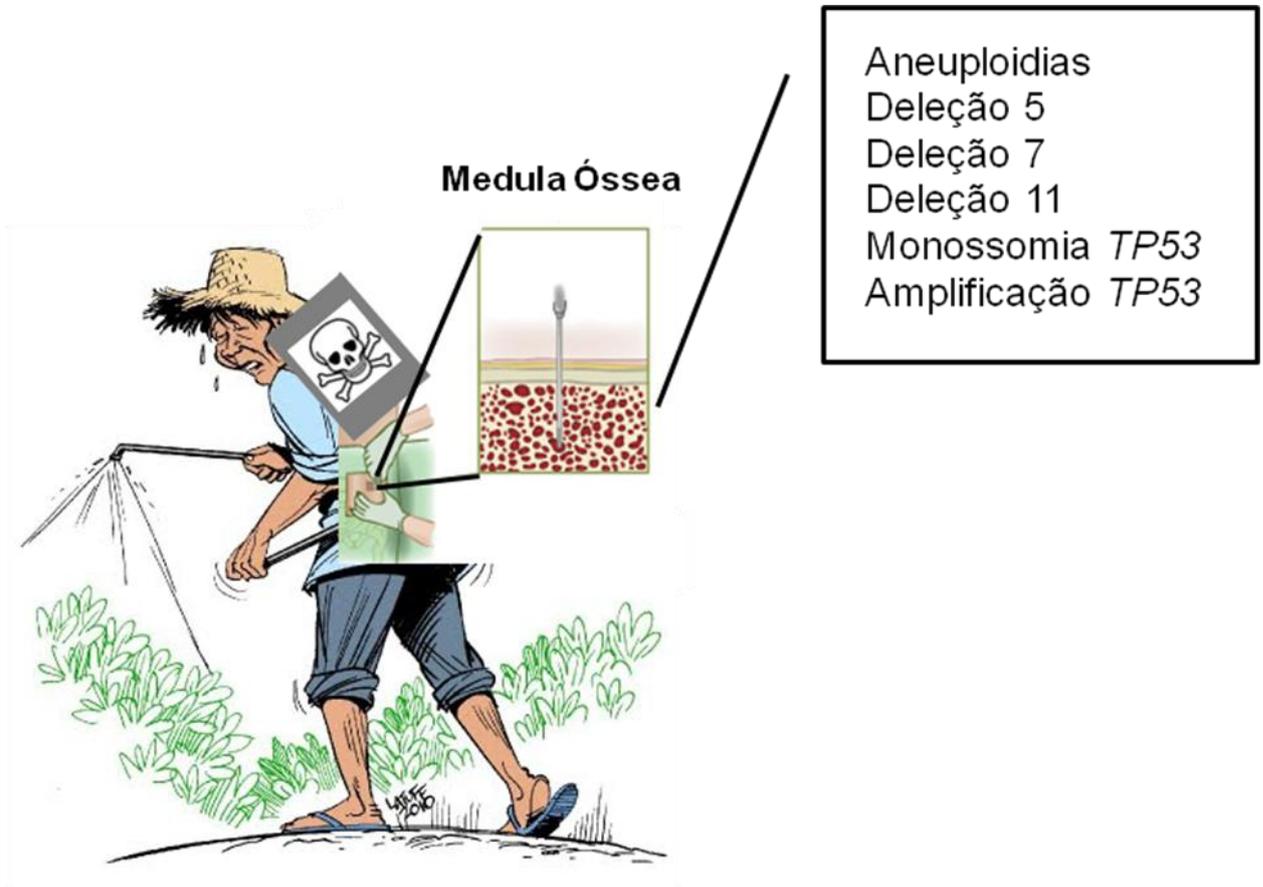
A amplificação do gene TP53 foi detectada em 3/31 indivíduos expostos. Amplificações do gene provocam um aumento no número de cópias do gene e, subsequentemente, elevam a sua expressão (Myllikangas ET al., 2006). Esta aberração pode ocorrer em resposta a danos no DNA, quando a proteína p53 induz uma parada transitória do ciclo celular permitindo que a célula faça reparos em danos sofridos pelo DNA (Kaneko et al., 1995).

Este trabalho é o primeiro a apresentar anomalias citogenéticas de células de medula óssea de trabalhadores rurais. Estes resultados reforçam uma série de estudos (Paz-y-Mino, 2002; Bortoli, 2009) que demonstram lesões do DNA em linfócitos de sangue periférico, utilizando o teste do cometa e método do micronúcleo. Nosso estudo destaca a importância da prevenção primária, pois apenas 23% dos trabalhadores rurais relatou medidas de proteção. Todas essas anormalidades citogenéticas aqui descritas são responsáveis por aumentar o risco de desenvolvimento de neoplasia. Diante desse achado, os trabalhadores rurais submetidos a exposição crônica e prolongada aos agrotóxicos devem ser biomonitorados frequentemente quanto à presença de alterações cromossômicas em suas células.

6 CONCLUSÕES

- A exposição crônica aos agrotóxicos nesse grupo de trabalhadores rurais não levou ao aparecimento de citopenias no sangue periférico.
- A exposição crônica aos agrotóxicos leva à ocorrência de alterações cromossômicas em células da medula óssea. As anormalidades encontradas são semelhantes às alterações descritas em doenças clonais da medula óssea como síndromes mielodispásicas e leucemias mielóides agudas;
- A exposição crônica aos agrotóxicos leva a alterações do gene *TP53* do tipo deleção, amplificação e aneuploidias;
- As técnicas de citogenética convencional e molecular por FISH são ferramentas importantes para o acompanhamento e biomonitoramento de trabalhadores rurais expostos aos agrotóxicos.

Figura 20 - Representação esquemática dos resultados obtidos neste estudo



REFERÊNCIAS

- Augusto, L G S.; Carneiro, F F; Pignati, W; Rigotto, R M; Friedrich, K; Faria, N M X. Búriço, A.C.; Freitas, V.M.T.; Guiducci Filho, E. Dossiê ABRASCO – Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. ABRASCO, Rio de Janeiro, junho de 2012. 2ª Parte. 135p.
- A Petitjean, MIW; Achatz, AL Borresen-Dale, P Hainaut, M Olivier. TP53 mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes. *Oncogene* 2007 26, 2157–2165.
- Aparicio S and Caldas C. The implications of clonal genome evolution for cancer medicine. *The New England Journal of Medicine*. 2013; 368: 842-51.
- Battershill JM, Boobis AR, Fletcher K, Bull S. Evidence for genotoxicity of pesticides in pesticide applicators: a review. *Mutagenesis* 2006; 21(2): 93-106.
- Barret C. Mechanisms of multistep carcinogenesis and carcinogen risk assessment. *Environmental Health Perspectives* 1993; 100: 9-20.
- Bellé R, Marc J. Pesticide Roundup provokes cell division dysfunction at the level of CDK1/cyclin B activation. *Chem. Res. Toxicol.* 2002; 15:326-331.
- Bhalli JA, Khan QM, Haq MA, Khalid AM and Nasim A. 2006. Cytogenetic analysis of Pakistani individuals occupationally exposed to pesticides in a pesticide production industry. *Mutagenesis* 21(2):143–148.
- Blair A, Chiu BCH: Pesticides, Chromosomal Aberrations, and Non-Hodgkin's Lymphoma. *J Agromedicine* 2009; 14(2): 250-255.
- Bolognesi C. Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. *Mutation Research* 2003; 543: 251–272
- Bueno et al. Plano Integrado de Ações de Vigilância em Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos. Ministério da Saúde (MS), 2009.
- Cabello G, Valenzuela M, Vilaxa A, Durán V, Rudolph I, Hrepic N, Calaf G. A rat mammary tumor model induced by the organophosphorous pesticides parathion and malathion, possibly through acetylcholinesterase inhibition. *Environmental Health Perspectives* 2001; 109 (5): 471-479.
- Calaf GM, Echiburu-Chau C. Roy D. Organophosphorous pesticides and estrogen induce transformation of breast cells affecting *p53* and *c-Ha-ras* genes. *International Journal of Oncology* 2009; 35: 1061-68.

Carneiro, F F; Pignati, W; Rigotto, R M; Augusto, L G S. Rizzolo, A; Faria, NMX; Alexandre, V P.; Friedrich, K; Mello, M S C. Dossiê ABRASCO – Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Parte 1 - Agrotóxicos, Segurança Alimentar e Nutricional e Saúde. Rio de Janeiro: ABRASCO, 2012.

Coleman WB, Tsongalis GJ. Molecular mechanisms of human carcinogenesis. *Cancer: Cell Structures, carcinogens and Genomic instability*. 2006.

Collins AR. The Comet Assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Molecular Biotechnology* 2004; 26: 249-261.

Duesberg P, Li R. Multistep carcinogenesis: a chain reaction of aneuploidizations. *Cell cycle* 2003; 2: 202-210.

Eastmond D, Pinkel D. 1990. Detection of aneuploidy and aneuploidy-inducing agents in human lymphocytes using fluorescence in situ hybridization with chromosome-specific DNA probes. *Mutation Research* 234: 303-318.

Eastmond DA, Schuler M, Rupa DS. 1995. Advantages and limitations of using fluorescence in situ hybridization for the detection of aneuploidy in interphase human cells. *Mutat Res* 348:153–162.

Ellery AEL; Arregi MMU; Rigotto MR. Câncer em trabalhadores rurais:face da iniquidade com a saúde da população camponesa. 2010.

Filipic M, Hreljac I, Zajc I, Lah T: Effects of Model Organophosphorous Pesticides on DNA Damage and Proliferation of HepG2 Cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 2008; 49:360-367.

Frohling S, Dohner H. 2008. Chromosomal abnormalities in cancer. *The New England Journal of Medicine* 359: 722-34.

Gauduchon P, Pottier D, Briand M, Lecluse Y, Lebailly P, Roulland S. Characterization of the t(14;18) BCL2-IGH translocation in farmers occupationally exposed to pesticides. *Cancer Research* 2004; 64: 2264-2269.

Gordon DJ, Resio B and Pellman D. 2012. Causes and consequences of aneuploidy in cancer. *Nature reviews genetics* 13: 189-203.

Gregorio LP and Colus IM. 2000 Cytogenetic and molecular biomonitoring of agricultural workers exposed to pesticides in Brazil. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* 20: 161–171.

Han J, Cao S, Zhang K, Zhao G, Xin Y, Dong Q, Yan Y, Cui J. 2012. Fluorescence in situ hybridization as adjunct to cytology improves the diagnosis and directs estimation of prognosis of malignant pleural effusions. *Journal of Cardiothoracic Surgery* 7:121.

Hoeijmakers JHJ. DNA damage, aging, and cancer. *N England J Medicine* 2009; 361: 1475-85.

Holland NT, Duramad P, Rothman N, Figgs LW, Blair A, Hubbard A and Smith MT 2002. Micronucleus frequency and proliferation in human lymphocytes after exposure to herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in vitro and in vivo. *Mutation. Research.* 521: 165–178.

Hoyos LS, Cravajal S, Solano L, Rodriguez J, Orzoco L, Lopez Y. and Au WW. 1996. Cytogenetic monitoring of farmers exposed to pesticides in Colombia. *Environmental Health Perspectives* 104: 535–538.

IARC. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to humans, International Agency for Research on Cancer, Lyon: IARC;2008. Acesso em 14 maio 2013. Disponível em: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/PDFs/index.php>.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo Agropecuário 2006. [Acesso em 12 dez. 2011] Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/2006/tabela1_3_1_0.pdf>.

Jenkins RB, Le Beau MM, Kraker WJ, et al. 1992. Fluorescence *in situ* hybridization: a sensitive method for trisomy 8 detection in bone marrow specimens. *Blood* 79:3307-15.

Kaneko H, Misawa S, Horiike S, Nakai H, Kashima K. 1995. TP53 mutations emerge at early phase of myelodysplastic syndrome and are associated with complex chromosomal abnormalities. *Blood* 85(8):2189-93.

Keller-Byrne JE, Khuder SA. Meta-Analyses of leukemia and farming. *Environment Res.* 1995;71; 1-10.

Keller-Byrne JE, Khuder SA. Meta-Analyses of prostate cancer and farming. *American Journal of Industrial Medicine.* 1997;31; 580-586.

Khan QM, Ali T, Bhalli JA, Rana SM. Cytogenetic damage in female Pakistani agricultural workers exposed to pesticides. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 2008; 49:374-380.

Khuder AS ET al. Meta-analyses of multiple myeloma and farming. *Am J Int Med.* 1997;32(5): 510-6.

Khuder AS ET al. Meta-analyses of non-hodgkin's lymphoma and farming. *Scandinavian Journal of Work, Environment and Health.* 1998;24(4): 225-261.

Krishnamurti U, Hammers JL, Atem FD, Storto PD, Silverman JF. 2009. Poor prognostic significance of unamplified chromosome 17 polysomy in invasive breast carcinoma. *Mod Pathol*, 22:1044–1048.

Kvitko K, Rohr P, Zucchetti G, Silla LMR. Aspectos ambientais e genéticos no desenvolvimento de leucemias. *Rev Brasileira de Biociências* 2008; 6(4): 369-373.

Lima DS, Cordeiro J, Magalhaes SM, Pinheiro RF. Interphase-FISH provides additional relevant information in myelodysplastic syndromes. *Leuk Res.* 2012;36(1):12-4

Londres Flavia. Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida. – Rio de Janeiro: AS-PTA – Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa, 2011.

Lubs, HÁ, Samuelson, L. Chromosome abnormalities in lymphocytes from normal human subjects. *Cytogenetics.* 1967; 6: 402-411.

Lucero L, Pastor S, Suarez S, Durban R, Gomez C, Parron T. and Marcos R. 2000. Cytogenetic biomonitoring of Spanish green house workers exposed to pesticides: micronuclei analysis in peripheral blood lymphocytes and buccal epithelial cells. *Mutation Research* 464: 255–262.

Machado JMH, Peres F, Hennington E, Beltrami AC. Reflexões e contribuições para o Plano Integrado de Ações de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde (MS) de populações expostas a agrotóxicos. *Rev Ciência e Saúde Coletiva* 2007; 12(1): 300-324.

Marc J, Bellé R. Formulated gluphosate activates the DNA-response checkpoint of the cell cycle leading to the prevention of G2/M transition. *Toxicological sciences.* 2004; 82:436-442.

Massoner A, Augustin F, Duba HC, Zojer N, Fiegl M. 2004. FISH cytogenetics and prognosis in breast and non-small cell lung cancers. *Cytometry B Clin Cytom* 62:52–56.

Myllikangas S, Himberg J, Bohling T, Nagy B, Hollmen J, Knuutila S. 2006. DNA copy number amplification profiling of human neoplasms. *Oncogene* 25: 7324–7332.

Mena S, Ortega A, Estrela JM. 2009. Oxidative stress in environmental-induced carcinogenesis. *Mutation Research* 674: 36-44.

Naka K, Hirao A. Maintenance of genomic integrity in hematopoietic stem cells. *International Journal of Hematology* 2011.

Nisse, C et al. Occupational and environmental risk factors of the myelodysplastic syndromes in the North of France. *British Journal of Hematology.* 2001; 112: 927-935.

Norppa H, Tuimala J, Szekely G, Wikman H, Järventaus H, Hirvonen A, Gundy S. Genetic polymorphisms of DNA repair and xenobiotic-metabolizing enzymes: effects on levels of sister chromatid exchanges and chromosomal aberrations. *Mutation Research* 2004; 554:319-333.

Oliveira PA, Colaço A, Chaves, R, Guedes-Pinto H, Lopes C. Chemical Carcinogenesis. *Na Acad Bras Cienc* 2007; 79(4): 593-616.

Olivier, M; Hollstein, M.; Hainaut, P. TP53 Mutations in Human Cancers: Origins, Consequences, and Clinical Use. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010;2:a001008.

Pastor S, Creus A, Xamena N, Siffel C and Marcos R 2002. Occupational exposure to pesticides and cytogenetic damage: results of a Hungarian population study using micronucleus assay in lymphocytes and buccal cells. *Environmental Molecular Mutagenesis*.40: 101–109.

Prasad S, Srivastava S, Singh M, and Shukla Y. 2009. Clastogenic Effects of Glyphosate in Bone Marrow Cells of Swiss Albino Mice. *Journal of Toxicology* 1-6.

Pacheco, Adil de Oliveira; Hackel, Christine. Chromosome instability induced by agrochemicals among farm workers in Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brazil. *Cad. Saúde Pública*, v. 18, n. 6, p. 1675-1683, nov./dez. 2002.

Paiva JCG, Cabral IO, Soares BM, Sombra CML, Ferreira JRO, Moraes MO, Cavalcanti BC, Pessoa C. 2011. Biomonitoring of rural workers exposed to a complex mixture of pesticides in the municipalities of Tianguá and Ubajara (Ceará state, Brazil): Genotoxic and cytogenetics studies. *Environmental and molecular mutagenesis* 52 (6): 492-501.

Paz-y-Mino C et al. Bustamante G, Sanchez ME, Leone PE. 2002. Cytogenetic monitoring in a population occupationally exposed to pesticides in Ecuador. *Environmental Health Perspectives* 110(11): 1077- 1080.

Pignati WA, Machado JMH, Cabral JF. Acidente Rural ampliado: o caso das “chuvas” de agrotóxicos sobre a cidade de Lucas do Rio Verde – MT. *Ciência e Saúde Coletiva* 2007; 12(1): 105-114.

Pinheiro RF, Serio FM, Silva MR, Briones MR, Chauffaille ML. Association of loss of heterozygosity with cytogenetic abnormalities in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *Braz J Med Biol Res.* 2008;41(7):610-4.

Pinheiro RF, Chauffaille ML. Comparison of I-FISH and G-banding for the detection of chromosomal abnormalities during the evolution of myelodysplastic syndrome. *Braz J Med Biol Res.* 2009; 42(11):1110-2.

Ramos, MESP. Biomonitoramento genético de indivíduos expostos ocupacionalmente a pesticidas no povoado Vila Bessa, município de Conceição do Jacuípe, Bahia. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia – UFC. Fortaleza, 2009.

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

Rigotto RM et al. Estudo epidemiológico da população da região do baixo Jaguaribe exposta à contaminação ambiental em área de uso de agrotóxicos. Pesquisa apoiada pelo CNPq e

Ministério da Saúde por meio do Edital MCT-CNPq/MS-SCTIEDECIT/CT- Saúde – Nº 24/2006. Fortaleza, 2010.

Roulland S, Agopian J, Navarro JM, Gac AC, Lecluse Y, Briand M, Grenot P, Gauduchon P, Ruminy P, Lebaillly P, Nadel B. Agricultural pesticide exposure and the molecular connection to lymphomagenesis. *Journal of Experimental Medicine* 2009; 206 (7): 1473-1483.

Rouquayrol, MZ; Almeida Filho, N. *Epidemiologia e Saúde*. 6. ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2003. 728 p.

Roy D, Calaf GM. Gene expression signature of parathion-transformed human breast epithelial cells. *International Journal of Molecular Medicine* 2007;19: 741-750.

Sailaja, N. et al. Genotoxic evaluation of workers employed in pesticide production. *Mutation Research*. 2006; 609: 74-80.

Schuz J, Meinert R, Kaletsch U, Kaatsch P, Michaelis J. Leukemia and Non-Hodgkin's Lymphoma in childhood and exposure to pesticides: results of a register case-control study in Germany. *American Journal of Epidemiology* 2000; 151(7): 639-646.

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

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.*1988; 175:184-191.

Smith ML, Fornace AJ Jr: Genomic instability and the role of p53 mutations in cancer cells. *Curr Opin Oncology* 1995; 7: 69-75.

Swerdlow SH. 2008. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization.

Valverde M, Rojas E. Environmental and occupational biomonitoring using the Comet assay. *Mutation Research* 2009; 681: 93–109.

Veiga MM, Duarte FJC, Meirelles LA. A contaminação por agrotóxicos e os Equipamentos de Proteção Individual (EPIs). *Rev. Bras. Saúde Ocup.*, São Paulo. 2007;32 (116): 57-68.

West RR, Stafford DA, White AD, Bowen DT, Padua RA. Cytogenetic abnormalities in the myelodysplastic syndromes and occupational or environmental exposure. *Blood* 2000; 95(6): 2093-2097.

Zeljezic D, Garaj-Vrhovac V. Chromosomal aberration and single cell gel electrophoresis (Comet) assay in the longitudinal risk assessment of occupational exposure to pesticides. *Mutagenesis* 2001; 16 (4): 359-363.

APÊNDICES

APÊNDICE A
Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



Universidade Federal do Ceará/UFC

Introdução: Estamos desenvolvendo uma pesquisa intitulada **Estudo das alterações citogenômicas na medula óssea de agricultores expostos a agrotóxicos no estado do Ceará, realizada pela Universidade Federal do Ceará (UFC)**, para a qual estamos coletando exames laboratoriais de pessoas que trabalham na plantação de banana, com o intuito de identificar os agravos à saúde daqueles que 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.

Telefone de contato:

Pesquisador responsável: Luiz Ivando Pires Filho: 85 -9933-5519

Sujeito da Pesquisa

APÊNDICE B
Questionário de Exposição aos Agrotóxicos

Você trabalha no cultivo da banana?

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

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

NOME: _____

DATA DE NASCIMENTO: _____ TELEFONE: _____

ENDEREÇO _____

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

PARTE 1 – CARACTERÍSTICA DEMOGRÁFICA

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

PARTE 2 - HÁBITOS DE VIDA

202	Você faz uso de algum tipo de bebida alcoólica?	Não bebo Raramente bebo Mensalmente Semanalmente Diariamente Não sei Não respondeu	1 2 3 4 5 88 99	→204
203	Qual o seu tipo de bebida preferida?	Cachaça Cerveja Vinho Conhaque Rum Vodka Outro (_____) Não respondeu	1 2 3 4 5 6 7 99	
204	Você tem o hábito de fumar?	Não fumo Raramente fumo Diariamente Não respondeu	1 2 3 99	→207
205	Qual a frequência do uso de fumo por você?	De 1 a 4 vezes ao dia De 5 a 9 vezes ao dia 10 a 19 vezes ao dia Mais de 20 vezes ao dia Não respondeu	1 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?	Sim Não Quem (_____) Não sei Não respondeu	1 2 3 88 99	→401
313	Que tipo de câncer essa pessoa da sua família apresentou?	Pele Mama Útero Ovário	1 2 3 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	→403
		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	88	
		Não respondeu	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	
		Irrigadores	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 pseudocaulé (tronco)	20	
		Embolsamento de cachos	21	
		Marcador de cacho	22	
		Rebaixador inicial	23	
		Rebaixador final	24	
		Desfolha	25	
		Colhedor de frutas	26	
		Pós-colheita	27	
		Tratorista	28	
		Cozinheiro	29	
		Outros	30	
		(_____)	99	
		Não respondeu		

PARTE 5 - CARACTERIZAÇÃO DA EXPOSIÇÃO DO TRABALHADOR

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

505	Em qual (ais) atividade(s) de trabalho você tem contato com agrotóxicos (veneno)?	Preparação de misturas Pulverização costal Pulverização aérea Armazenamento Descarte de embalagem Limpeza de roupa Limpeza do equipamento Gotejamento contínuo Transporte Trabalho em área pulverizada Embalagem do produto final Outros (_____) Não sei Não respondeu	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 88 99	
506	Nos períodos de pulverização aérea, o seu contato com o veneno acontece:	Durante a pulverização, pois você permanece em sua função Você ajuda a sinalizar para o avião com bandeira Você entra no bananal logo após a pulverização Você mora perto das áreas pulverizadas Não sei Não respondeu	1 2 3 4 88 99	
508	Quais são os agrotóxicos (veneno) que você tem contato? OBS: os que estão grifados são herbicidas	Bayfidan EC Bórax Bravonil 500 <u>Carbofuran</u> Cercobin 500SC Cobre Atar BR Comet Cuprozeb Domark 100EC <u>Finale</u> Flare Folicur 200 CE Fugiscan 700WP Garant <u>Gramocil</u> <u>Gramoxone 200</u> Ícarus Impact 125SC Juno 250CE Manzate 800 Metiltiofan Mythos Nativo Opera Opus SC Orius 250EC <u>Roundup</u> Score <u>Scout NA</u> Soprano 125SC Soprano 25 EC Stratego 250 EC Sulfato de cobre Support Tango Cash Tecto SC Tilt Triade Triazol Virtue Outros (_____) Não sei Não respondeu	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 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 2,4 – D Propanil Tamaron (Metamidofós)	1 2 3 4 5 6 7	
513	Quanto tempo você trabalhou com esses agrotóxicos?	Menos de 01 ano De 01 a 04 anos De 05 a 08 anos De 08 a 12 anos Mais de 12 anos Outro (_____) Não sei Não respondeu	1 2 3 4 5 6 7 8	

PARTE 6 - MEDIDAS DE CONTROLE DO RISCO ADOTADAS PELO TRABALHADOR

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

PARTE 9 – HISTÓRIA CLÍNICA DO TRABALHADOR

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

Entrevistador:

Obrigado por ter participado

APÊNDICE C

1 - Reuniões para aplicação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ao grupo de sujeitos envolvidos na pesquisa.



2 - Demonstração do procedimento de coleta de medula óssea



3 - Coleta de sangue periférico para hemograma



4 - Coleta de aspirado de medula óssea para análise citogenética



5 – Posto de Saúde da comunidade onde foi realizada a coleta de amostras



6 – Grupo de profissionais envolvidos no trabalho de coleta das amostras

