



Universidade Federal de Goiás
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular

**AVALIAÇÃO CITOGENÉTICA E MOLECULAR DE INDIVÍDUOS
OCUPACIONALMENTE EXPOSTOS AOS AGROTÓXICOS**

MARIANA PEDROSA BATISTA

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS (TEDE) NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: **Dissertação** **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor (a):	Mariana Pedrosa Batista		
E-mail:	marianabiomed@gmail.com		
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página?	<input checked="" type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	
Vínculo empregatício do autor	Não		
Agência de fomento: <u>Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior</u>		Sigla:	CAPES
País:	Brasil	UF:	DF
CNPJ:	00889834/0001-08		
Título:	Avaliação Citogenética e Molecular de Indivíduos Ocupacionalmente Expostos a Agrotóxicos		
Palavras-chave:	polimorfismos; GSTT1; GSTM1; translocação 14;18; agrotóxicos; intoxicação		
Título em outra língua:	Cytogenetic and Molecular Assessment of Individuals Occupationally Exposed to Pesticides		
Palavras-chave em outra língua:	Polymorphism; GSTT1; GSTM1; translocation 14;18; agrochemicals; poisoning		
Área de concentração:	: Genômica Funcional, Estrutural e Proteômica		
Data defesa: (dd/mm/aaaa)	28/02/2014		
Programa de Pós-Graduação:	Genética e Biologia Molecular		
Orientador (a):	Profa. Dra. Daniela de Melo e Silva		
E-mail:	silvadanielamelo@gmail.com		
Co-orientador(a):*	Prof. Dr. Aparecido Divino da Cruz		
E-mail:	acruz@pucgoias.edu.br		

*Necessita do CPF quando não constar no SisPG

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Assinatura do (a) autor (a)

Data: ____ / ____ / ____

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.



**Programa de Pós-Graduação em
Genética e Biologia Molecular**

Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Goiás



MARIANA PEDROSA BATISTA

**AVALIAÇÃO CITOGENÉTICA E MOLECULAR DE INDIVÍDUOS
OCUPACIONALMENTE EXPOSTOS AOS AGROTÓXICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal de Goiás como Requisito Parcial Para Obtenção do Título de Mestre.

Orientadora: Prof^a Dr^a Daniela de Melo e Silva

Goiânia, fevereiro de 2014.

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação na (CIP)
GPT/BC/UFG**

Batista, Mariana Pedrosa.
B288a Avaliação Citogenética e Molecular de Indivíduos
Ocupacionalmente Expostos a Agrotóxicos [manuscrito] /
Mariana Pedrosa Batista. - 2014.
54 f. : il., figs, tabs.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Daniela de Melo e Silva; Co-
orientador: Aparecido Divino da Cruz

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás,
Instituto de Ciências Biológicas, 2014.

Bibliografia.

Inclui lista de figuras e tabelas.

Apêndices.

1. Trabalhadores rurais – Agrotóxicos 2. Trabalhadores
rurais – Intoxicação 3. Agrotóxicos – Intoxicação I. Título.

CDU: 631.5-057.2



Universidade Federal de Goiás
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular

**AVALIAÇÃO CITOGENÉTICA E MOLECULAR DE INDIVÍDUOS
OCUPACIONALMENTE EXPOSTOS AOS AGROTÓXICOS**

MARIANA PEDROSA BATISTA

Goiânia, fevereiro de 2014.



**Programa de Pós-Graduação em
Genética e Biologia Molecular**
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Goiás



MARIANA PEDROSA BATISTA

**AVALIAÇÃO CITOGENÉTICA E MOLECULAR DE INDIVÍDUOS
OCUPACIONALMENTE EXPOSTOS AOS AGROTÓXICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal de Goiás como Requisito Parcial Para Obtenção do Título de Mestre.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Daniela de Melo e Silva

Goiânia, fevereiro de 2014.

Dedico a todos os agricultores que participaram desta pesquisa, que debaixo do sol, enfrentam a dura realidade do homem do campo.

Para a realização do presente estudo houve a colaboração das seguintes instituições: Universidade Federal de Goiás (UFG), Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular; Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC Goiás), Núcleo de Pesquisas Replicon, Laboratório de Citogenética e Genética Molecular Humana (LaGene).

Agradecimentos

Agradecer é sempre muito difícil, pois não há “obrigada” que exprima o valor da colaboração, da boa vontade e da ajuda de bom grado. Esta é, sem dúvida, a parte mais complicada e prazerosa deste estudo. Difícil, porque minhas palavras, por melhor escolha que faça, não farão jus à imensa gratidão que desejo expressar e, prazerosa, pois em cada uma destas linhas trago boas lembranças desta jornada.

Agradeço a Deus por me dar mais esta oportunidade e me cercar de tantas pessoas boas a quem também devo agradecer.

Aos meus pais, Francisco (Mô) e Isabel (Mamys), e minhas irmãs Ana Gabriela (Bi), Jackeline (Keké) e Fernanda (Espremida) por todo apoio incondicional, carinho, paciência, amor, “paitrocínio” sempre que necessário, e a toda minha família por compreenderem minha ausência e acreditarem na realização deste trabalho, me estimulando a prosseguir sempre.

Ao meu melhor amigo e namorado, Danilo, por todos os conselhos, incentivos, paciência, companheirismo, por iluminar meus dias com seu sorriso e me dar forças para continuar mesmo no auge do cansaço.

As minhas biomédicas preferidas por me aguentarem sempre! As anapolinas que mesmo distantes se fazem tão presentes. As minhas Divas por todas as horas de patinação e risadas. Aos “Malditos” queridos por todo apoio.

A Universidade Federal de Goiás, ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular e as instituições de fomento pela oportunidade de aprofundar meus conhecimentos.

A Profa. Dra. Elisângela de Paula Silveira Lacerda e aos membros do LGMC por me iniciarem nessa trajetória.

A toda equipe da Humana Medicina Reprodutiva, pelo apoio, compreensão e torcida para a realização deste trabalho.

A todo Núcleo de Pesquisa Replicon da PUC Goiás, por terem me recebido de braços abertos, em especial a Fernanda Godoy por todos os ensinamentos; Douglas e Damiana pela cultura de células; Aldáires pela incrível disposição em ajudar sempre; Cristiano pela paciência nas longas horas de capturas e a todos os outros que ficavam no escuro enquanto capturávamos; Alessandro, obrigada por adiantar minha vida, por escutar os desabafos e estar sempre pronto para “leitoar”; Juliana e Lilian pelos momentos de descontração e a todos os outros pelo carinho, palavras de conforto e abraços que só encontramos na PUC.

Aos Professores Dr. Aparecido Divino da Cruz (Peixoto) e Dr. Cláudio Carlos da Silva pelos ensinamentos e apoio profissional.

Aos membros da banca avaliadora, por toda a atenção dispensada na avaliação deste trabalho.

E em especial, mas muito especial mesmo a minha Orientadora, Profa. Dra. Daniela de Melo e Silva, não existem palavras para agradecer por me “adotar”, por ser esse anjo na minha vida, pelos seus conselhos, incentivo, confiança, por não se importar com hora, dia, momento para ajudar na elaboração desta dissertação. Minha eterna gratidão!

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Gráfico do aumento da área de cultivo e utilização de fertilizantes e agrotóxicos no Brasil nos anos de 2008 a 2011	12
Figura 2	Curva de amplificação da PCR em tempo real.....	19
Figura 3	Representação esquemática de um ciclo de PCR em tempo real utilizando SYBR Green 21	
Figura 4	Representação esquemática da translocação entre os cromossomos 14 e 18.....	23
Figura 5	Regiões da sonda IGH/BCL2	25
Figura 6	Sonda IGH/BCL2 em núcleos interfásicos e metáfases de indivíduos não-portadores de translocação t(14;18)	25
Figura 7	Sonda IGH/BCL2 em núcleos interfásicos e metáfases de indivíduos portadores de translocação t(14;18)	26
Figura 8	Municípios goianos onde as coletas de amostras biológicas foram realizadas	28
Figura 9	Curvas de <i>melting</i> dos <i>primers</i> RH92600, GSTM1 E GSTT1	35
Figura 10	Translocações t(14;18)(q32,q31).....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Classe de agrotóxicos utilizados no Brasil e respectivas colorações das faixas indicativas presentes nos rótulos das embalagens	14
Tabela 2 Principais sinais e sintomas clínicos apresentados após intoxicações por agrotóxicos	16
Tabela 3 Tipos de mutações cromossômicas.....	22
Tabela 4 Características gerais dos <i>primers</i> utilizados para a análise dos polimorfismos de <i>GSTM1</i> e <i>GSTT1</i> nos trabalhadores e grupos controles.....	30
Tabela 5 Protocolo de termociclagem para a genotipagem dos <i>primers</i> RH92600, <i>GSTM1</i> e <i>GSTT1</i>	31
Tabela 6 Dados sócio-epidemiológicos dos trabalhadores ocupacionalmente expostos aos agrotóxicos	33
Tabela 7 Características sócio-ambientais dos grupos expostos e controle	34
Tabela 8 Distribuição das frequências genótípicas dos grupos caso e controle	35
Tabela 9 Distribuição dos genótipos de acordo com o tabagismo	36
Tabela 10 Distribuição dos genótipos de acordo com o consumo de álcool	36
Tabela 11 Distribuição dos genótipos quanto ao tempo de exposição aos agrotóxicos, uso de EPIs e intoxicação, no grupo de trabalhadores expostos ocupacionalmente	37

SUMÁRIO

	RESUMO	x
	ABSTRACT	xi
1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1	Agrotóxicos.....	14
2.2	Alterações genéticas induzidas pela exposição ocupacional a agrotóxicos.....	16
2.3	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em Tempo Real.....	19
2.4	Alterações cromossômicas	21
2.5	Hibridização Fluorescente <i>in situ</i> (FISH).....	23
3	OBJETIVOS	27
3.1	Objetivos gerais	27
3.2	Objetivos específicos.....	27
4	MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1	Grupo amostral.....	28
4.2	Coleta de amostras	29
4.3	Cultura de células sanguíneas e FISH	29
4.4	Extração, quantificação e análise molecular.....	30
4.5	Análise estatística.....	31
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
6	CONCLUSÕES.....	40
	REFERÊNCIAS	41
	ANEXO I - Protocolo do comitê de ética.....	49
	ANEXO II – Protocolo de FISH.....	50
	APÊNDICE I - TCLE	52
	APÊNDICE II - Questionário.....	54

RESUMO

Os trabalhadores rurais estão constantemente expostos aos agrotóxicos que utilizam nas lavouras, e esta exposição pode ser responsável por danos genéticos causando um risco para a saúde. Um dos problemas da utilização de agrotóxicos é a genotoxicidade, que pode levar ao aparecimento de doenças. Pouco se sabe sobre a relação entre a genotoxicidade e a variação de polimorfismos genéticos de metabolização de xenobióticos que podem modificar a suscetibilidade individual aos possíveis efeitos genotóxicos dos agrotóxicos. Por isso, há a necessidade do estudo de genes como a glutationa-S-transferase mu (*GSTM1*) e glutationa-S-transferase teta (*GSTT1*) que codificam enzimas de detoxificação de compostos genotóxicos. Outra avaliação importante em indivíduos expostos a agrotóxicos é a pesquisa da translocação cromossômica t(14;18)(q31;q21), a qual pode ser investigada em nível molecular. Nesse sentido, esse estudo avaliou os polimorfismos dos genes *GSTT1* e *GSTM1*, em 120 indivíduos ocupacionalmente expostos aos agrotóxicos e de 115 controles (sem exposição aos agrotóxicos), pela metodologia de PCR em tempo real. As frequências de genótipos *GSTM1* e *GSTT1* encontradas foram de 49% e 18%, respectivamente, para o grupo exposto e 37% e 18%, respectivamente, para o grupo controle. Verificou-se que não há maior possibilidade de intoxicação em trabalhadores que apresentam genótipos nulos. Não houve correlação estatisticamente significativa entre o aumento do risco de intoxicação e o consumo de álcool, tabaco e uso de EPI. Além disso, 29 trabalhadores, expostos a agrotóxicos por mais de 15 anos e com genótipos nulos, *GSTT1* e/ou *GSTM1*, foram avaliados quanto à presença da translocação t(14;18)(q31; q21), pela análise de 100 células, por Híbridação Fluorescente *in situ* (FISH). Com essa análise, a translocação foi observada em apenas um indivíduo, a qual pode ter sido causada pela exposição prolongada a agrotóxicos, aumento da idade ou consumo de álcool. Dessa forma, o estudo de polimorfismos genéticos e translocações, como biomarcadores de suscetibilidade é de importância fundamental na compreensão dos processos de distribuição genotípica envolvidos na mutagênese e carcinogênese e poderia ajudar a minimizar os riscos para indivíduos suscetíveis que são expostos a agrotóxicos.

Palavras-chave: polimorfismos, *GSTT*, *GSTM*,; translocação 14;18, agrotóxicos, intoxicação.

ABSTRACT

Rural workers are constantly exposed to pesticides they use on crops, and this exposure may be responsible for genetic damage causing a health risk. A problem with the use of pesticides is the genotoxicity, which can lead to the onset of disease. Little is known about the relationship between genotoxicity and the variation of genetic polymorphisms of xenobiotic metabolism that may modify individual susceptibility to the possible genotoxic effects of pesticides. Therefore, there is a need to study genes as glutathione-S-transferase mu (*GSTM1*) and theta glutathione S-transferase (*GSTT1*) encoding detoxification enzymes of genotoxic compounds. Another important assessment in individuals exposed to pesticides is the presence of chromosomal translocation t(14;18) (q31,q21), which can be investigated at the molecular level. Thus, this study evaluated the polymorphisms of *GSTM1* and *GSTT1* genes in 120 individuals occupationally exposed to pesticides and 115 controls (without exposure to pesticides), by real-time PCR. The frequencies of *GSTM1* and *GSTT1* genotypes were found in 49 % and 18 %, respectively in the exposed group and 37 % and 18 %, respectively, for the control group. It has been found that there is a greater possibility of poisoning in workers who have null genotypes. There was no statistically significant correlation between the increased risk of intoxication and alcohol consumption, smoking and use of PPE. In addition, 29 workers exposed to pesticides for more than 15 years and with null genotypes in *GSTT1* and / or *GSTM1*, were evaluated for the presence of the t (14;18)(q31, q21), in 100 nuclei, by fluorescent in situ hybridization (FISH) . The translocation was observed in only one individual, which may have been caused by prolonged exposure to pesticides, increasing age or alcohol consumption. Thus, the study of genetic polymorphisms and translocations as biomarkers of susceptibility is of fundamental importance in understanding the processes involved in genotype distribution mutagenesis and carcinogenesis and could help minimize the risks for susceptible individuals who are exposed to pesticides.

Keywords: polymorphism, *GSTT1*, *GSTM1*, translocation 14;18, agrochemicals, poisoning.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos líderes mundiais na produção e exportação de vários produtos agropecuários (Ministério da Agricultura – MAPA, 2012). É o principal produtor e exportador de café, açúcar, etanol de cana-de-açúcar e laranja e lidera o ranking das vendas externas do complexo soja (farelo, óleo e grãos). Além disso, o crescimento da produção agrícola no Brasil deve continuar acontecendo com base na produtividade. As projeções indicam que tanto a produção de grãos e a área de cultivo deverão expandir-se em 9,5% em 2020-21 (Companhia Nacional de Abastecimento – CONAB, 2012).

Conseqüentemente, esta intensa demanda agrícola no país reflete na necessidade de aumentar, cada vez mais, a utilização de agrotóxicos (Figura 1). Nos últimos anos, o Brasil vem ocupando o lugar de maior consumidor de agrotóxicos no mundo, de acordo com a Associação Brasileira de Saúde Coletiva (ABRASCO, 2012).

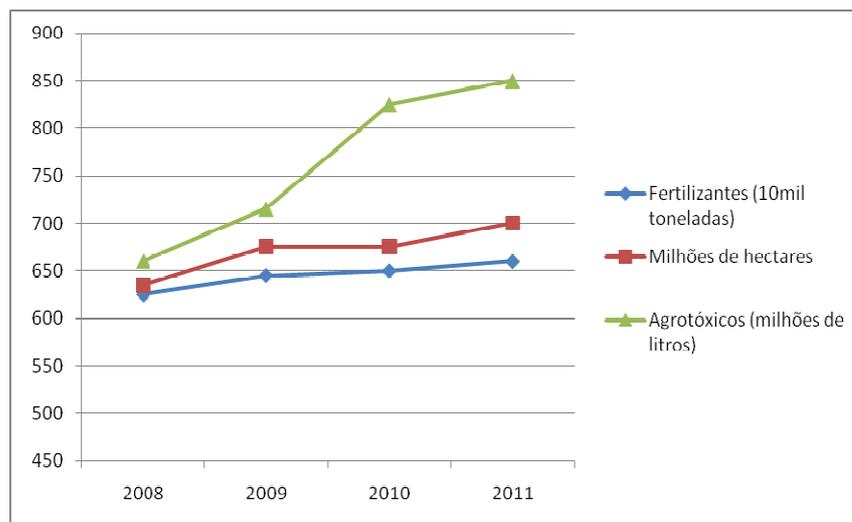


Figura 1. Gráfico do aumento da área de cultivo e utilização de fertilizantes e agrotóxicos no Brasil nos anos 2008 a 2011. Fonte: Modificado de ABRASCO, 2012

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) (2010), os agrotóxicos estão entre os mais importantes fatores de risco para a saúde da população em geral, especialmente para os agricultores e para os ecossistemas próximos as áreas agrícolas. Em função da grande diversidade dos produtos, há cerca de 300 ingredientes ativos e 2 mil formulações comerciais diferentes no Brasil, sendo classificados quanto ao tipo de toxicidade, ação e ao grupo químico a que pertencem (Nagem, 2013).

Várias agências de controle ambiental e de saúde vêm demonstrando o potencial destes compostos como agentes poluidores do ambiente e conseqüentemente, nocivos à vida, em

particular, à saúde humana (Nagem, 2013). Estimativas feitas pela OMS são preocupantes e suas atenções se voltam para ocorrências de intoxicações agudas, resultantes do contato direto com produtos altamente tóxicos. Tais intoxicações podem acarretar consequências imediatas ou problemas crônicos (Carneiro, 2012).

A exposição ocupacional de trabalhadores agrícolas e agentes de saúde ocorre geralmente por falta de informação ou recursos técnicos qualificados. Desta forma, equipamentos de proteção individual (EPIs) tendem a não ser utilizados no momento do preparo e utilização dos pesticidas, sobretudo por nem sempre estarem adequados à realidade e ao clima do Brasil e algumas vezes não são sequer fornecidos (Peres e Moreira, 2007).

Os possíveis efeitos tóxicos da exposição a agrotóxicos são conhecidos, porém, as informações da toxicidade relacionada aos ingredientes ativos, não são suficientes para avaliar o risco dos efeitos adversos dos pesticidas à saúde humana e ambiental (Ribeiro et al., 2009). Em relação à genotoxicidade, a determinação das alterações genéticas nos indivíduos expostos aos pesticidas pode ser utilizada como marcador de efeito biológico, fornecendo um quadro geral da exposição aos agrotóxicos (Bochner, 2009).

O termo "biomarcador" é utilizado para expressar uma interação entre um dado sistema biológico e um agente genotóxico. A importância da utilização desses biomarcadores como parâmetros biológicos da exposição a substâncias químicas está diretamente relacionada com o efeito na saúde e pode, assim, oferecer melhores estimativas de risco (Angerer et al., 2007).

Exemplos de biomarcadores que podem ser utilizados na avaliação do risco de trabalhadores ocupacionalmente expostos a agrotóxicos, são as grandes famílias dos genes, como a da Glutathione S-transferase (*GST*) (Hatagima et al., 2002). Como as enzimas codificadas por esses genes realizam um importante passo na detoxificação de xenobióticos, torna-se claro que a ausência de suas atividades pode levar a um aumento na toxicidade, na suscetibilidade a mutações e no desenvolvimento de tumores (Bull et al., 2006).

A análise genética também é importante para pesquisa de alterações cromossômicas, tais como translocações, adições e deleções. Um exemplo é a translocação (14;18), que leva à hiperexpressão do gene *bcl-2* e da proteína BCL-2 em pacientes com linfoma folicular, cujo desenvolvimento parece relacionar-se à idade, ao fumo, ao sexo e à exposição a agrotóxicos (Jong, 2005).

Nesse contexto, o presente estudo contribui para se compreender os riscos de agravo à saúde humana decorrente da exposição individual, fornecendo subsídios para reforçar a necessidade da adesão do trabalhador às condições de segurança ocupacional que visam à manutenção da saúde física e a proteção contra o desenvolvimento das doenças ocupacionais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Agrotóxicos

Os agrotóxicos são compostos químicos usados em grande escala por vários setores produtivos e mais intensamente pelo setor agropecuário, são ainda utilizados na construção e manutenção de estradas, tratamento de madeiras para construção, armazenamento de grãos e sementes, produção de flores, combate às endemias e epidemias. Podem apresentar-se em diferentes formulações: sólidos, líquidos e gasosos. Alguns são comercializados pronto para o uso e outros precisam ser diluídos em água antes da aplicação (Silva, 2005).

De modo geral, todos os agrotóxicos são classificados quanto aos tipos de organismos que controlam (fungicidas, inseticidas, herbicidas, entre outros), quanto aos grupos químicos aos quais pertencem (organofosforados, carbamatos, piretroides, organoclorados, bupiridilos, ácidos fenoxiacéticos, outros) e quanto à toxicidade das substâncias (extremamente tóxico a pouco tóxico)(Gilman, 2006).

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (2011), a classificação toxicológica é fundamental para o conhecimento da toxicidade de um produto, do ponto de vista dos seus efeitos agudos (Tabela 1).

Tabela 1: Classes de agrotóxicos utilizados no Brasil e respectivas colorações das faixas indicativas presentes nos rótulos das embalagens (modificado de Silva, 1999).

<i>Classe</i>	<i>Toxicidade</i>	<i>Cor da faixa</i>
I	Extremamente tóxicos	Vermelha
II	Altamente tóxicos	Amarela
III	Medianamente tóxicos	Azul
IV	Pouco tóxicos	Verde

Embora economicamente benéfico ao setor agrícola e ao comércio especializado, o alto consumo de agrotóxicos pode estar relacionado ao uso indiscriminado e possivelmente ao não cumprimento de medidas que visem à garantia da segurança alimentar da população e dos trabalhadores rurais que, combinado a outros fatores, contribuem para que resíduos dos agrotóxicos afetem a saúde de consumidores, produtores e trabalhadores rurais de maneira ocupacional (Ribeiro et. al., 2009).

O elevado e indiscriminado uso de agrotóxicos no Brasil tem contribuído para a contaminação ambiental e para o aumento dos casos de intoxicações, principalmente as de origem ocupacional (Pignati et al., 2007; Jacobson et al, 2009).

Soma-se ao uso indiscriminado de agrotóxicos: a falta de orientação técnica, o desconhecimento dos riscos associados ao uso, instruções no rótulo de difícil compreensão, manipulação e aplicação sem os devidos equipamentos de proteção individual (EPI), o não conhecimento das normas de descarte de embalagens, entre outros. Todos estes fatores potencializam os riscos de intoxicações pelos trabalhadores do meio rural (Radis, 2010).

Diversos são os profissionais que têm contato com os agrotóxicos, como os trabalhadores do setor agropecuário, da saúde pública, do transporte, do comércio e das indústrias de formulação e síntese. Destacam-se ainda as famílias desses agricultores que manipulam as roupas utilizadas por eles, ou moram próximo as áreas pulverizadas (Peres e Moreira, 2007).

A maioria dos estudos não considera a interação que os diversos compostos químicos podem estabelecer entre si e os sistemas biológicos, sendo que essa interação pode até mesmo modificar o comportamento tóxico de um determinado produto, acarretando efeitos diversos sobre a saúde do grupo de trabalhadores expostos. Ressalte-se que a mistura de produtos se dá não apenas no campo, pela ação direta dos agricultores, mas também por meio das próprias empresas (Sindag, 2003).

Os agrotóxicos podem ser absorvidos pelo corpo humano pelas vias digestiva, respiratória e absorção dérmica. A absorção pela derme varia de acordo com a formulação, temperatura, umidade relativa do ar, as regiões do corpo (dorso das mãos, pulsos, nuca, pés, axilas e virilhas absorvem mais), o tempo de contato e presença de feridas (Garcia, 2001).

Sabe-se que a exposição a um determinado produto químico em grandes doses por um curto período causa os chamados efeitos agudos, eventos amplamente descritos na literatura médica. A associação causa/efeito é, geralmente, fácil de ser estabelecida. Ao contrário, os chamados efeitos crônicos, que estão relacionados com exposições por longos períodos e em baixas concentrações, são de reconhecimento clínico bem mais difícil, principalmente quando há exposição a múltiplos contaminantes, situação bastante comum no trabalho agrícola. Há, neste caso, maior dificuldade para o reconhecimento de uma associação causa/efeito (Alavanja et al., 2004; Colosso et al., 2003). A Tabela 2 apresenta uma síntese dos principais sinais e sintomas agudos e crônicos (Brasil, 1997).

Tabela 2. Principais sinais e sintomas clínicos apresentados após intoxicações por agrotóxicos.

Sinais e sintomas agudos	Náusea, cefaleia, tontura, vômito, desorientação, dificuldade respiratória, coma, morte.
Sinais e sintomas crônicos	Paresia e paralisia reversíveis, ação neurotóxica retardada irreversível, pancitopenia.

Fonte: Manual de Vigilância da Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos, 1996, OPAS/OMS (Brasil, 1997)

Alguns trabalhos demonstram que a resposta do organismo humano diante das exposições laborais, pode ser influenciada por algumas características, tais como tabagismo, alcoolismo e o estado nutricional. Concordam, ainda, quanto a:

1) Substâncias químicas e temperaturas elevadas – o aumento da temperatura atmosférica aumenta a volatilidade e a pressão de vapor das substâncias químicas, aumentando sua disponibilidade para inalação e/ou absorção cutânea. Aumenta também a velocidade circulatória, aumentando ainda mais a absorção (Chaves, 2007).

2) Substâncias químicas e esforço laboral – o esforço físico aumenta a ventilação pulmonar. Assim, o organismo se vê exposto a maiores quantidades de tóxicos existentes no ar (Chaves, 2007).

Segundo estatísticas oficiais do Ministério da Saúde (MS) (2010), utilizando o Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (SINITOX), é possível verificar 149.171 casos de intoxicações por agrotóxicos em geral no Brasil no período de 1999 a 2009 (Nagem, 2013).

A dificuldade de acesso dos agricultores a unidades de saúde, o despreparo das equipes de saúde para relacionar problemas de saúde com o trabalho e com a exposição aos agrotóxicos de forma particular, os diagnósticos incorretos, a escassez de laboratórios de monitoramentos biológicos e a inexistência de biomarcadores precoces e/ou confiáveis, são alguns dos fatores que influem no sub-diagnóstico e no sub-registro. Portanto, pode-se afirmar que os dados oficiais brasileiros sobre intoxicações por agrotóxicos não retratam a gravidade de nossa realidade (Nagem, 2013)

2.2 Alterações genéticas induzidas pela exposição ocupacional a agrotóxicos

Holland et al. (2008) consideram que a maioria das lesões no material genético são devidas a exposição ambiental a genotoxinas (radiação e produtos químicos). Além disso, fatores como a deficiência de micronutrientes (folato), estilo de vida (álcool, fumo, drogas, e estresse), e fatores

genéticos, tais como defeitos hereditários no metabolismo e/ou reparo do Ácido Desoxiribonucleico (DNA), também contribuem na indução de danos genéticos.

Kumar & Das, (2009) publicaram uma análise sobre os fatores ambientais que estão diretamente ou indiretamente associados com o câncer, e relataram uma evidente associação entre linfoma e o grupo de agrotóxicos caracterizados quimicamente como organoclorados, como o 1,3 dicloropropeno, e o herbicida 2,4 ácido diclorofenoxiacético.

A maior parte dos agentes mutagênicos presentes nos agrotóxicos exibem um espectro de mutações característico, que depende de vários fatores, incluindo a natureza das alterações primárias no DNA como: modificações de base, mudanças nos resíduos de açúcar ou fosfato, quebras de filamentos, ou incorporações de bases modificadas, e os subsequentes efeitos secundários, causados pela resposta do organismo a estas modificações. Estes efeitos secundários podem incluir a ação de várias formas de reparo do material genético e a duplicação de filamentos filhos sobre moldes modificados (Reis et al., 2011).

Tendo em vista a ampla utilização de agrotóxicos no controle de pragas no sistema de produção agrícola nacional e produtos alimentares gerados por este sistema produtivo, consumidos pela população, torna-se importante avaliar os possíveis efeitos mutagênicos, citotóxicos e genotóxicos para a saúde humana.

Vários métodos são aplicados para mensurar o potencial dos agrotóxicos em induzir danos genéticos no DNA. Um considerável número de estudos tem sido conduzido usando biomarcadores para avaliar a genotoxicidade em células de trabalhadores expostos a agrotóxicos (Nagem, 2013). Os testes para o biomonitoramento de danos ao material genético são importantes para avaliação de efeitos crônicos de agentes mutagênicos, que não são detectados em exames comumente usados para avaliação clínica. Portanto, devem ser implementados, para uma maior segurança sobre os possíveis danos genéticos, como uma forma de prevenção de doenças relacionadas à instabilidade do material genético (como o câncer) que normalmente acontecem anos após a exposição a agentes mutagênicos, como os agrotóxicos (Bolognesi et al., 2002).

A genotoxicidade está relacionada com a capacidade de um determinado agente físico, químico ou biológico em modificar a estrutura do DNA, resultando em alterações, como mutações gênicas, deleções, rearranjos cromossômicos e quebras simples e duplas (Lubin e Boice Jr, 1997; Ribeiro, 2003). As alterações no genoma humano, decorrentes do ambiente, estilo de vida, dieta e de atividades ocupacionais, geram uma preocupação quanto às medidas de proteção da população (Burim et al., 2004).

Grande parte das substâncias, potencialmente capazes de alterar um genoma, requer uma ativação metabólica no organismo, antes de se tornarem efetivamente carcinogênicas. A

suscetibilidade de um organismo ao câncer parece depender da capacidade de metabolizar e eliminar essas substâncias do organismo de forma eficiente (Kumar et al., 2012).

Diferentes estudos indicam que inúmeros sistemas genéticos de controle e modulação do metabolismo enzimático de xenobióticos parecem estar envolvidos na gênese de diferentes tipos de câncer (Gateva et al., 2001; Safarinejad et al., 2011; Calderón-Segura et al., 2012). Um dos polimorfismos metabólicos que tem sido associado de forma mais consistente ao aumento do risco de câncer é o da glutathione S-transferase (GST) (Abhishek et al., 2010; Reis, 2011; Schneider, 2011).

A superfamília GST compreende uma grande variedade de proteínas citosólicas, mitocondriais, e microssomais, sendo capazes de realizar reações com uma grande variedade de substratos, tanto endógenos quanto xenobióticos. São principalmente encontradas no fígado, podendo ser achadas no pulmão e intestino (De Oliveira Hiragi et al., 2011; Kvitko et al., 2012).

Atualmente, possuem oito classes distintas: alfa, kappa, mu, omega, pi, sigma, teta e zeta (Singhet al., 2011). A classe mu, possui pelo menos 5 genes distintos para GSTM, os quais foram clonados e sequenciados: *GSTM1*, *GSTM2*, *GSTM3*, *GSTM4* e *GSTM5*. Todos os genes foram mapeados no braço curto do cromossomo 1. Dentre os genes desta família encontra-se o *GSTM1*, situado no locus 1p13.1, que é polimórfico possuindo dois alelos funcionais (*GSTM1*A* e *GSTM1*B*) e eficientes na atividade metabólica.

A proteína GSTM1A contém uma lisina na posição 172, enquanto a proteína GSTM1B contém asparagina na mesma posição. O gene *GSTM1* pode apresentar um polimorfismo genético caracterizado pela deleção total, resultando no genótipo homozigoto nulo *GSTM1*0* (nulo 0/0), caracterizando um indivíduo sem atividade enzimática (Arruda et al., 1998).

A classe teta consiste em 2 genes, *GSTT1* e *GSTT2*, localizados no cromossomo 22q11.2 e separados por aproximadamente 50Kb. Ambos os genes possuem 5 éxons com divisões idênticas de íntron/éxon, mas seus produtos proteicos possuem apenas 55% da identidade nos aminoácidos que compõe suas estruturas primárias. Análises revelaram 2 regiões flangeadoras (HA3 e HA5) contendo repetições idênticas de 403pb, que foram identificadas como regiões deleção/junção do genótipo nulo (Sprenger et al., 2000).

O gene *GSTT1*, assim como o gene *GSTM1* apresenta polimorfismo genético, caracterizado pela deleção total do gene (genótipo *GSTT1* nulo ou 0/0), resultando na falta das proteínas ativas. A deleção em homozigose do gene *GSTM1* é observada em frequências que variam de 20 a 70% nas diferentes populações, enquanto que para o gene *GSTT1* esta variação é de 11 a 38% (Arruda et al., 1998).

Os compostos GST-conjugados são geralmente hidrofílicos e atóxicos e, portanto, são facilmente excretados (Duarte, 2005). Como as enzimas codificadas por esses genes realizam um

importante passo na detoxificação de xenobióticos, torna-se claro que a ausência de sua atividade pode levar a um aumento na toxicidade e na susceptibilidade ao desenvolvimento de tumores malignos (Kumar et al., 2011).

2.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em tempo real

Em 1993, Higuchi e seus colaboradores descreveram pela primeira vez a PCR em tempo real. Esses pesquisadores montaram um sistema ao qual acoplaram uma câmara de vídeo, de modo a monitorizar a PCR durante todos os ciclos. Este mecanismo permitia-lhes detectar o aumento da fluorescência durante a reação, devido à ligação do brometo de etídio às moléculas de DNA de dupla cadeia recém-sintetizadas (Higuchi et al., 1993).

O procedimento é semelhante ao da técnica da PCR convencional, diferindo essencialmente numa característica inovadora: a possibilidade de quantificação em tempo real do DNA amplificado, em cada ciclo de amplificação. Neste método, as fases de amplificação, detecção e quantificação são totalmente automatizadas, ocorrendo em simultâneo (Heid et al., 1996).

O sucesso da técnica rapidamente levou ao seu aperfeiçoamento. Diversas plataformas de instrumentação foram criadas e comercializadas, no entanto, a maioria é composta por um termociclador, com sistema óptico para a excitação e recolha da emissão da fluorescência e um computador com *software* próprio para a aquisição de dados e análise final da reação (Chang, 2010).

Como em uma PCR convencional apresentam as três fases características (fase de crescimento linear, fase de crescimento exponencial e platô), entretanto os compostos fluorescentes adicionados ao DNA na PCR em tempo real geram um sinal de fluorescência que é diretamente proporcional à quantidade de produto amplificado ao longo das diferentes fases e que podem ser representados graficamente como demonstrados na Figura 2 (Bucharth et al., 2007; Oliveira, 2010).

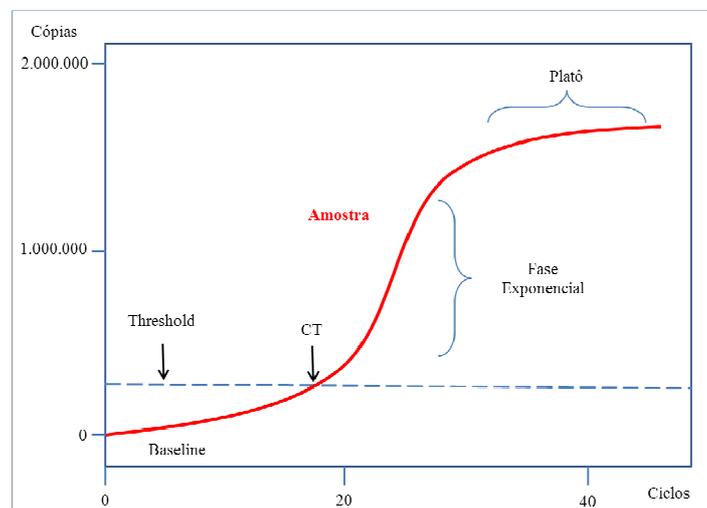


Figura 2. Curva de amplificação da PCR em tempo real. CT – cycle threshold.

A interpretação dos resultados obtidos pelos equipamentos obriga que se definam conceitos específicos, como *baseline* e *cycle threshold* (CT). A *baseline* corresponde ao limiar mínimo de detecção de fluorescência do instrumento sendo considerado ruído de fundo do equipamento. O ponto CT corresponde ao número de ciclos necessários para que a fluorescência da reação seja detectável. Trata-se de um ponto a partir do qual a fluorescência detectada ultrapassa o limiar da fase exponencial, conhecido também na literatura como *threshold*, definido automática e arbitrariamente pelo *software* do equipamento em função da *baseline* (Pelt-Verkuil et al., 2008).

O valor mínimo de CT é dependente da quantidade de moléculas presente no início do processo de amplificação, o que significa que um menor número de moléculas inicialmente representa um maior número de ciclos requeridos para gerar um aumento exponencial do sinal da fluorescência que seja significativamente superior à *baseline* (Kubista et al., 2006; Mackay et al., 2007; Pelt-Verkuil et al., 2008).

Os corantes intercalantes são fluorocromos sem especificidade para uma sequência particular de DNA, que se intercalam na dupla cadeia de qualquer produto da PCR permitindo a sua detecção. Contudo o correto design dos *primers* confere elevada especificidade da detecção e quantificação a estes métodos (Mackay et al., 2007).

A tecnologia SYBR® *Green* baseia-se num conjunto de moléculas com a capacidade de se ligar de forma covalente à dupla cadeia de DNA e quando excitadas emitem uma fluorescência verde que é medida e convertida numa quantidade de DNA (Mackay et al., 2007).

No início do processo a fluorescência é reduzida, visto que as moléculas SYBR® *Green* livres não estão ligadas ao DNA de dupla cadeia e como tal, o sinal produzido é mínimo. Ao longo do processo, após a detecção dos *primers*, quantidades crescentes dos fluorocromos ligam-se à dupla cadeia de DNA pré-sintetizada pela enzima *Taq DNA polimerase*. No fim da fase de extensão de cada ciclo, a fluorescência é monitorizada e quantificada e, conseqüentemente o DNA amplificado é determinado (Correia, 2007; Mackay et al., 2007).

A literatura refere que o correto desenho dos *primers* torna-se determinante na especificidade do DNA a amplificar. Contudo, alguns estudos demonstraram que a SYBR® *Green* liga-se preferencialmente a produtos da PCR cuja temperatura de *melting* seja superior, indicando a sua potencial preferência por regiões ricas em guanina e citosina. Desta forma, a especificidade dos resultados deve ser validada através de uma análise da temperatura de *melting* (Correia, 2007; Mackay et al., 2007).

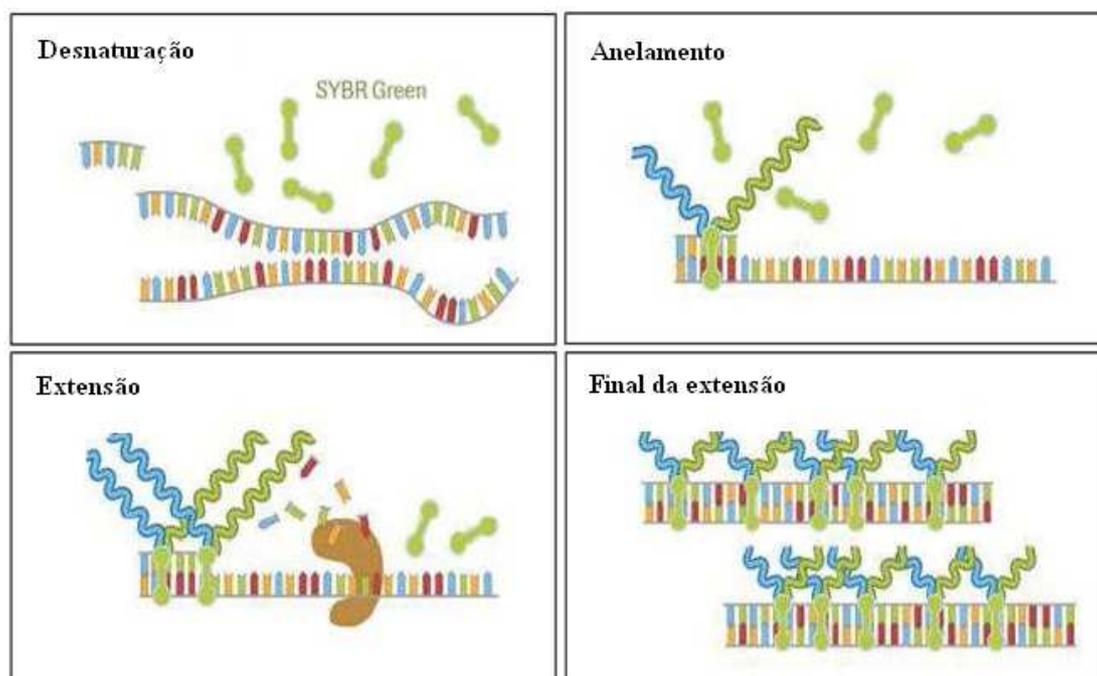


Figura 3. Representação esquemática de um ciclo de PCR em tempo real utilizando *SYBR Green*.

Fonte: Modificado de <http://www.gene-quantification.de/chemistry.html>.

Define-se temperatura de *melting* como a temperatura na qual metade dos fragmentos de DNA está na forma desnaturada, ou seja, não pareados. As principais vantagens das curvas de melting estão relacionadas com a possibilidade da confirmação da(s) sequência(s) do(s) produto(s) da PCR, com a sua alta especificidade (cada produto tem a sua própria temperatura de *melting*), com o reduzido risco de contaminação (o capilar utilizado é fechado), com o fato de diferenciar produtos da PCR específicos dos inespecíficos e com a possibilidade de caracterizar polimorfismos de inserção/deleção e detectar mutações (Espy et al., 2006; Carvalho, 2007; Mackay et al., 2007).

2.4 Alterações cromossômicas

A alteração cromossômica é umas das ferramentas mais importantes no biomonitoramento de populações ocasionalmente expostas a pesticidas (Watson et al., 2007). Uma mutação pode ser definida como uma alteração na sequência do DNA, sendo geralmente permanente (Niwa, 2006). As mutações podem ser espontâneas, sendo a frequência de ocorrência dependente do organismo, ou ainda, induzidas, podendo ser ocasionadas pela exposição a agentes mutagênicos. A mutagenicidade de um agente químico, físico ou biológico pode ser avaliada de acordo com o aumento da frequência de mutações induzidas em relação à frequência basal de mutações (Westman, 2006).

As mutações podem ser cromossômicas e gênicas. Mutações gênicas são alterações nas sequências de nucleotídeos do DNA. Podem se originar por erros incorporados durante o processo

de replicação do DNA ou por falha no sistema de reparo do DNA, resultando em alterações em genes individuais (Watson et al., 2007). As mutações cromossômicas resultam em alterações na morfofisiologia dos cromossomos. Podem afetar desde uma determinada região até um cromossomo inteiro e traduzem-se em alterações numéricas ou estruturais (Tabela 3) (Thompson & Thompson, 2008).

Tabela 3. Tipos de mutações cromossômicas

Mutações Cromossômicas	Tipos	Função
Estruturais	Deleção	Perda de um segmento cromossômico
	Duplicação	Um segmento do cromossomo está repetido
	Translocação	Transferência recíproca ou não-recíproca de um segmento cromossômico de um cromossomo para outro
	Inversão	Um único cromossomo sofre duas quebras e é reconstituído com o segmento entre as quebras, invertido
Numéricas	Euploidia	Poliploide com número de cromossomos que é um múltiplo exato de um conjunto cromossômico básico
	Aneuploidia	O número de cromossomos não é um múltiplo exato do conjunto haploide

Fonte: Klug et al., 2013.

A translocação t(14;18) tem sido extensivamente investigada em nível molecular (Masir et al., 2009; Cerroni & Wiesner, 2009; Machado et al., 2013; Young et al., 2013; Zhang, 2013; Soldini, 2013). Translocações cromossômicas que desregulem a expressão de oncogenes ou que alterem sua constituição são mutações marcantes em neoplasias hematopoiéticas malignas (Blair et al., 1992).

Um importante exemplo é a t(14;18)(q32;q21), uma translocação entre os cromossomos 14 e 18 que produz uma ativação constitutiva do oncogene *BCL-2* (Figura 1). As translocações cromossomais envolvendo o gene *BCL2* são características do Linfoma Folicular (LF). Como consequência da translocação, o gene *BCL2* (18q21) é justaposto à região promotora do gene *IgH* (14q32) resultando em um desequilíbrio em seu padrão normal, levando à super expressão do oncogene *BCL2* (Evans et al., 2003).

Os LF são repetidamente, mas não consistentemente associados à exposição individual aos pesticidas (Blair et al., 1992). A incidência parece estar também relacionada com idade, histórico de fumo e sexo (Jong, 2005).

Todavia a t(14;18) também pode ser encontrada em sangue periférico de indivíduos saudáveis, em uma frequência aproximada de <1 a 40 translocações por milhão de linfócitos (Roulland et al., 2003).

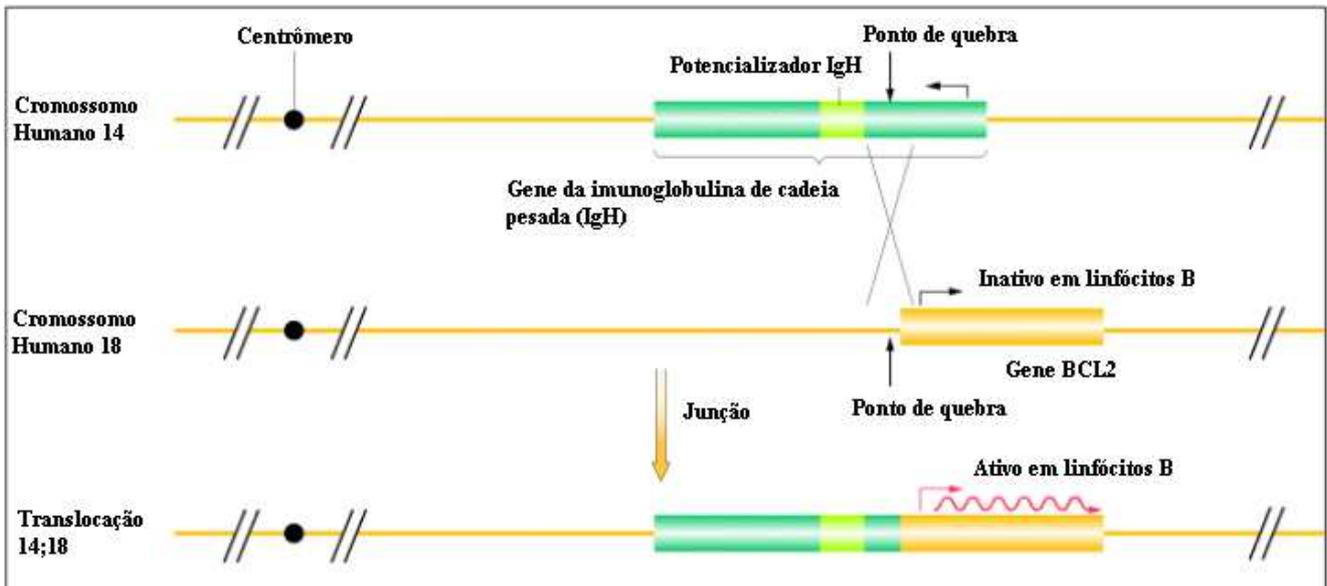


Figura 4. Representação esquemática da translocação entre os cromossomos 14 e 18. Próximo do ponto de quebra do cromossomo 14 localiza-se um potencializador transcricional do gene de imunoglobulina. Este elemento transcricional é fusionado ao gene *BCL2*, que é um regulador negativo da apoptose. Esta fusão potencializador-*bcl2* induz a super expressão de *BCL2* de linfócitos B. Devido ao bloqueio da apoptose os linfócitos B mutantes tem um tempo de vida incomum e desta forma se acumulam. Fonte: Griffiths et al., 2013.

2.5 Hibridização Fluorescente *in situ* (FISH)

A hibridização é uma reação muito dinâmica em que uma sequência alvo desnaturada e uma sonda de fita simples de DNA ou RNA complementar formam um híbrido estável pela ação do calor (Swinger e Tucker, 1996).

Em 1969, Gall e Pardue desenvolveram a primeira técnica de hibridização *in situ* utilizando sondas marcadas com radioisótopos. Os procedimentos experimentais necessitavam de longos períodos de exposição para produzir sinais mensuráveis nos filmes radiográficos, deixando o processo lento (Ploeg, 2000).

A introdução da FISH, primeiramente desenvolvida por Bauman et al. (1980), proporcionou um aumento significativo da resolução, rapidez e segurança. Contribuiu mais tarde para desenvolvimento da detecção simultânea de múltiplos alvos e a quantificação de microrganismos

em um único procedimento, tornando-se rapidamente numa tecnologia aplicada tanto na biologia quanto na citogenética (Ploeg, 2000; Levsky e Singer, 2003).

No procedimento da FISH, o princípio básico é o anelamento da sonda com a sequência alvo, para a visualização em microscópio fluorescente. Entende-se por sonda, uma sequência de oligonucleotídeos complementares e específicos marcados com substâncias fluorescentes os quais se anelam ao alvo (Neves e Guedes, 2012).

A sonda hibridizada fluoresce quando os cromossomos são vistos com um comprimento de onda que excita o corante fluorescente. A localização do sinal de hibridização e, portanto, o local do segmento de DNA ao qual a sonda se hibridiza é então observada ao microscópio (Thompson & Thompson, 2008).

Sondas específicas de genes ou locus podem ser usadas para detectar a presença, ausência ou localização de um determinado gene tanto em cromossomos metafásicos quanto em células interfásicas. Há ainda a utilização de fluorocromos diferentes para detectar múltiplas sondas simultaneamente as quais são rotineiramente usadas para diagnosticar deleções específicas, duplicações ou translocações (Thompson & Thompson, 2008).

A sonda *IGH/BCL2* é utilizada para identificar translocações entre os cromossomos 14 e 18. Consiste em uma sonda verde que abrange os segmentos constantes e variáveis do gene *IGH* no cromossomo 14, e uma sonda vermelha que abrange os genes *FVT1* e *BCL2* no cromossomo 18 (Figura 5). Em células não portadoras de translocações, essas sondas aparecem como discretos pontos verde e vermelho, um em cada homólogo (Figura 6). Em indivíduos com translocação t(14;18), a região constante da sonda de *IGH* permuta com a porção proximal do *BCL2* e vice versa, resultando em uma fusão de sinais (verde e vermelho), resultando em um sinal amarelo (Figura 7) (Protocolo *Aquarius*®*Citocell*).

A FISH tem uma grande variedade de aplicações dentro de diferentes campos de investigação, incluindo análise de danos cromossomais, mapeamento genético, toxicologia molecular, genômica comparativa, biologia evolutiva e diagnóstico de doenças (Swiger e Tucker, 1996; Volpi e Bridger, 2008).

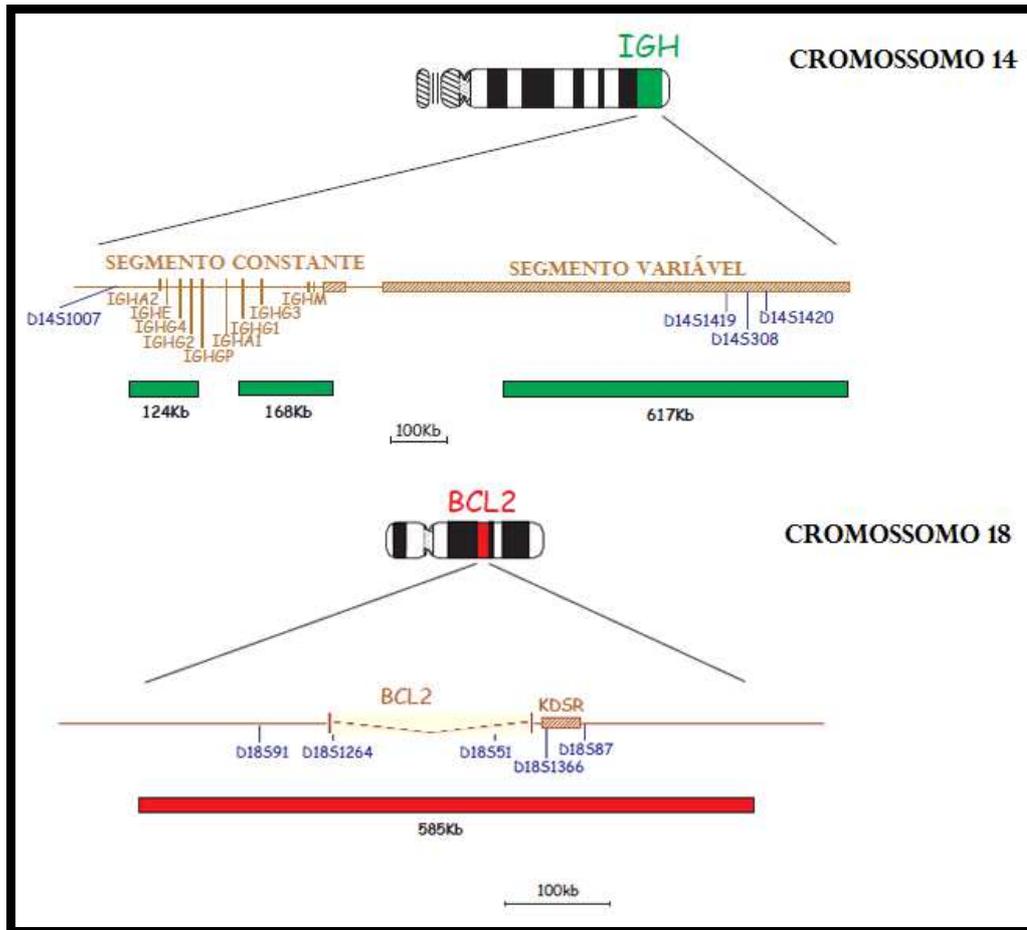


Figura 5. Regiões da sonda IGH/BCL2 Aquarius® Citocell.

Fonte: Modificado de <http://www.cytocell.co.uk/products/aquarius/haematology-probes/IGH-BCL-2-Translocation-probe.asp>

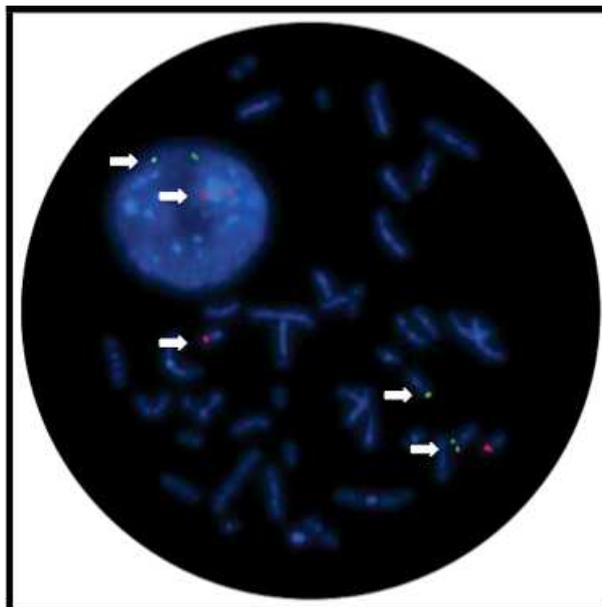


Figura 6. Sonda IGH/BCL2 em células interfásicas e metáfases em indivíduos não-portadores de translocação (Setas indicando cromossomos 14-verde e 18-vermelho).

Fonte: Modificado de <http://www.cytocell.co.uk/products/aquarius/haematology-probes/IGH-BCL-2-Translocation-probe.asp>

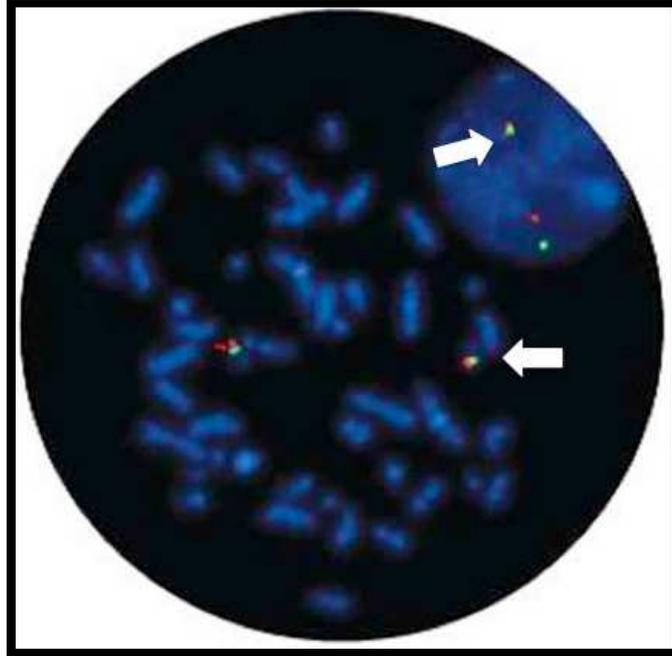


Figura 7. Sonda IGH/BCL2 em células interfásicas e metáfases em indivíduos com translocação t(14;18) (setas indicando translocações entre os cromossomos 14 e 18).

Fonte: Modificado de <http://www.cytocell.co.uk/products/aquarius/haematology-probes/IGH-BCL-2-Translocation-probe.asp>

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

• Avaliar a variabilidade polimórfica de *GSTT1* e *GSTMI* em indivíduos ocupacionalmente expostos a agrotóxicos, em municípios goianos com intensa atividade agrícola, visando avaliar se os eventos de intoxicação estão associados a genótipos de risco e se estes deixam o indivíduo mais susceptível à translocações t(14;18)(q32, q21).

3.2 Objetivos específicos

- Analisar o tempo de exposição dos trabalhadores aos agrotóxicos por meio de um questionário sócio-ambiental;
- Comparar as frequências genótípicas de *GSTT1* e *GSTMI* no grupo ocupacionalmente exposto com as obtidas para o grupo controle;
- Associar os dados sócio-ambientais do grupo exposto com os polimorfismos de *GSTT1* e *GSTMI*;
- Associar o polimorfismo dos genes *GSTT1* e *GSTMI* com o uso de EPIs e os eventos de intoxicação no grupo ocupacionalmente exposto aos agrotóxicos;
- Pesquisar a presença de translocação t(14;18)(q32, q21) nos indivíduos que apresentarem genótipo nulo para *GSTT1* e/ou *GSTMI* e que tenham tempo de exposição igual ou superior a 15 anos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Grupo Amostral

O presente estudo foi uma pesquisa do tipo caso-controle, no qual foram avaliados 120 trabalhadores expostos aos agrotóxicos, em municípios goianos. Os 12 municípios do Estado de Goiás selecionados para o estudo podem ser visualizados na Figura 8. Além desse grupo, foram avaliados 115 indivíduos, saudáveis, também de municípios goianos, que apresentaram as mesmas condições sócio-ambientais que os trabalhadores expostos, mas que nunca sofreram exposição ocupacional a agrotóxico, perfazendo o grupo controle. Tais indivíduos foram escolhidos aleatoriamente e as amostras de sangue foram obtidas voluntariamente, de acordo com o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice I). Dados como idade, hábitos sociais, tempo de exposição e tipos de agrotóxico utilizados foram relatados em um questionário sócio-ambiental para a realização dos dados estatísticos (Apêndice II). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, com o protocolo de número 1978/2011 (Anexo I), devido ao fato de que todas as análises moleculares foram realizadas no Núcleo de Pesquisas Replicon e no Laboratório de Citogenética e Genética Molecular Humana, da Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUCGO).

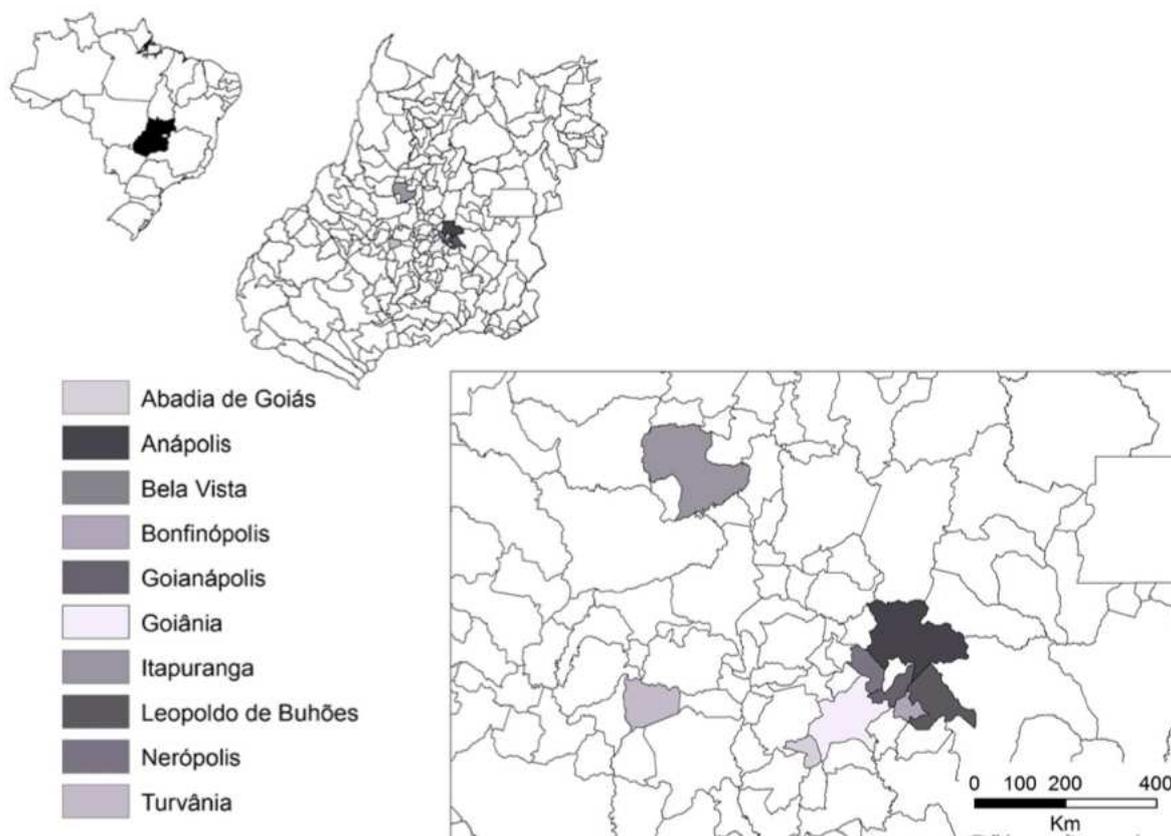
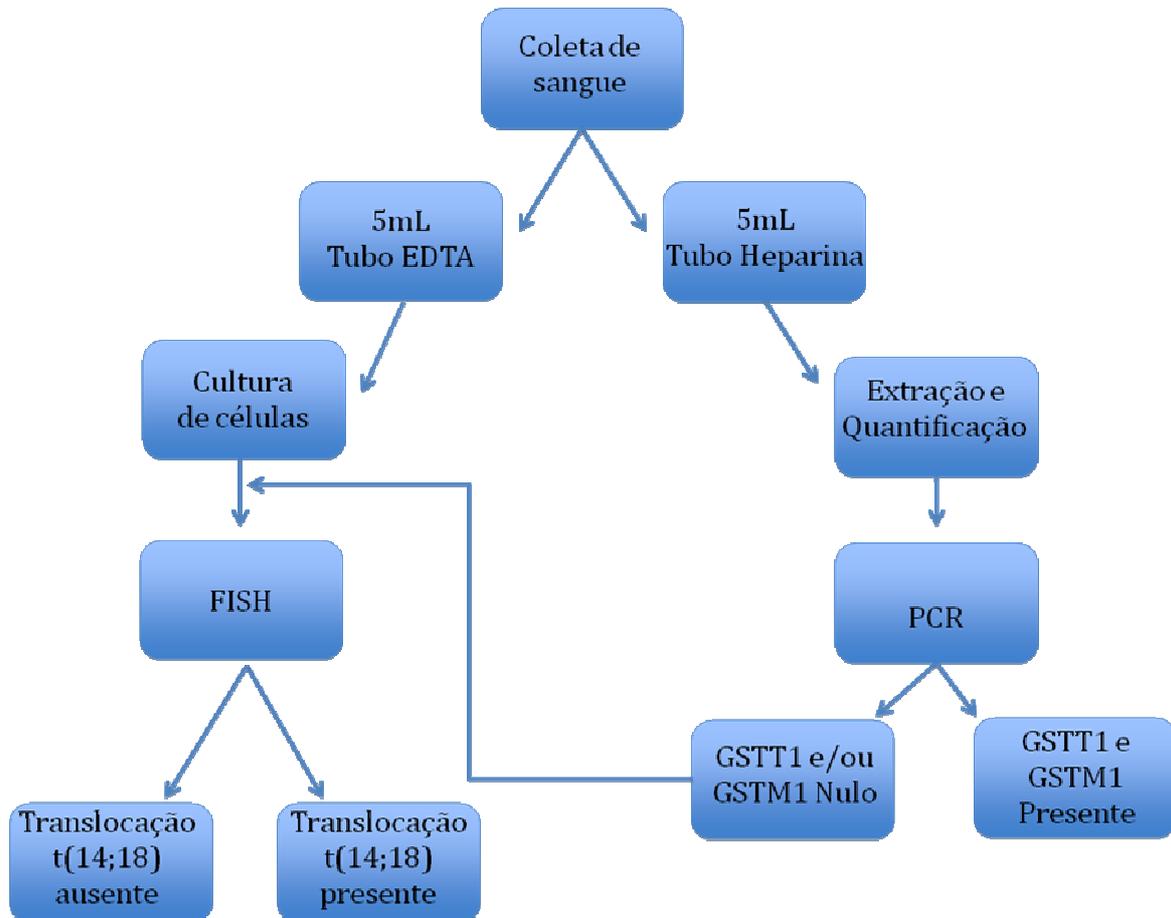


Figura 8. Municípios goianos onde as coletas de amostras biológicas foram realizadas.

4.2 Coleta das amostras

Após a assinatura do TCLE, as amostras biológicas foram obtidas a partir de coleta de 10 ml de sangue periférico dos trabalhadores rurais (5 ml em tubo heparinizado para a cultura de células e 5 ml em tubo EDTA para extração de DNA), sendo armazenadas em isopor com gelo e encaminhadas imediatamente ao laboratório. Os experimentos foram realizados de acordo com o fluxograma abaixo:



4.3 Cultura de células sanguíneas e FISH

As amostras de sangue periférico heparinizado foram submetidas imediatamente à cultura de linfócitos T, devido à sua degradabilidade, conforme protocolos convencionais para a obtenção de metáfases (Verma e Babu, 1989). A cultura de células foi armazenada em solução de Carnoy até a liberação dos resultados da qPCR.

Após selecionar os indivíduos com genótipo GSTT1 e/ou GSTM1 nulos, a suspensão de células foi gotejada sobre vapor de banho-maria a 60°C, em lâminas limpas e desengorduradas.

A técnica de Hibridização Fluorescente *in situ* (FISH) foi realizada conforme protocolo sugerido pelo fabricante das sondas utilizadas, *IGH/BCL2 Translocation, Dual Fusion LPH 018 (Aquarius®Cytocell, Reino Unido)* (Anexo II).

A captura das imagens foi realizada utilizando o sistema de fotomicrografia de epifluorescência *AxiImage2*® (Carl Zeiss, Alemanha) equipado com lâmpada de mercúrio HBO – 100W, platina motorizada e conjuntos de filtros (emissão/excitação) para fluorescência (FITC – 550/540nm, DAPI - 340/440nm e TRICT – 660/570nm) e o Software *ISIS/CGH*® (Metasystems, Alemanha).

4.4 Extração, quantificação e análise molecular

Para a extração de DNA foi utilizado o Kit de extração de DNA *Purelink™ Genomic DNA Mini Kit* (Invitrogen, EUA), de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante. A quantificação da concentração de DNA (ng/μL) existente em cada amostra de sangue periférico foi realizada utilizando *Nanovue™* (GE, EUA), de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante.

Para a análise das deleções de *GSTM1* e *GSTT1* utilizou-se a técnica PCR em Tempo Real com o fluoróforo *SYBR Green Master Mix* (Life Technologies, EUA), e com a co-amplificação do gene *RH92600*, o qual amplifica uma região de microssatélite de 135pb localizado em 6q13, usado como controle interno da reação. Os *primers* utilizados e as condições de PCR foram previamente sugeridos por Abdel-Rahma et al. (1996), com adaptações (Tabela 4 e 5).

Tabela 4. Características gerais dos *primers* utilizados para a análise dos polimorfismos de *GSTM1* e *GST1* nos trabalhadores e grupo controle

Marcador	Seqüência	T.M. ¹
<i>RH92600</i> *	F: 5' TCATATGCAAAACAGCTTCCC 3'	75° C
	R: 5' CTGGTCCTTCAAGCCTGTATG 3'	
<i>GSTM1</i>	M1F: 5'GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC3'	78° C
	M1R: 5' GTTGGGCTAAATATACGGTGG 3'	
<i>GSTT1</i>	T1F: 5' TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC 3'	83° C
	T1R: 5' TCACCGGATCATGGCCAGCA 3'	

* Controle endógeno da reação; ¹ T.M. = Temperatura de *melting*.

Tabela 5. Protocolo de termociclagem para a genotipagem dos *primers* *RH92600*, *GSTM1* e *GSTT1*.

<i>Etapas</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Tempo (min.)</i>	<i>Ciclos</i>
Desnaturação inicial	94	5	1
Desnaturação	94	30s	
Anelamento	50	45s	30
Extensão	72	1	
Extensão final	72	7	1
Armazenamento	4	∞	∞

O volume utilizado na PCR foi de 15µl, contendo aproximadamente 10ng/µl de DNA das amostras previamente quantificadas, 0.06 nmoles de cada *primer*, 1X PCR *Buffer* (5 mM de KCl, 1mM de Tris-HCl), 2.5 mM de MgCl₂, 0.10mM de cada dNTP e 2.5U Taq DNA polimerase *High Fidelity* (Life Technologies, EUA). Para cada *primer* foi obtida uma curva de dissociação (*melting curve*).

4.5 Análise estatística

Os dados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais foram arquivados em uma planilha do programa Excel (MICROSOFT)®, para posterior análise estatística realizada no programa Bioestat 5.0 (Ayres & Ayres, 2007). A associação de significância foi avaliada pelos testes qui-quadrado e regressão logística múltipla. Foi utilizado um intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 6 ilustra os dados sócio-epidemiológicos dos trabalhadores ocupacionalmente expostos. Dos 120 trabalhadores, 119 informaram a idade, destes, 45% apresentaram idades entre 30 a 50 anos, sendo a média de idade de 40 anos. Quanto ao uso de EPIs, 52% dos trabalhadores relataram fazer uso constante de tais equipamentos, durante a aplicação e/ou manipulação dos agrotóxicos. Quanto à função, 71% dos expostos manipulavam e aplicavam os agrotóxicos, e 42 % já se intoxicaram durante o uso, tendo relatado sintomas como dor de cabeça, náuseas, tonturas, desmaios, tremores, vertigens, salivação excessiva, convulsões, irritação e dores no corpo. O tempo de exposição dos trabalhadores foi relatado por 114 trabalhadores, e variou de 03 meses a 40 anos, sendo a média de contato de 13 anos.

Esses dados corroboram com os encontrados no SINITOX (2011), onde foram registrados 4.436 casos de intoxicação por agrotóxicos agrícolas no Brasil no ano de 2011. Destes, 386 foram relatados na região centro-oeste. Entretanto, por mais grave que pareçam estes números, a realidade é que eles estão muito aquém de representar o número real das intoxicações por agrotóxico de uso agrícola. Segundo Bochner (2007), é importante ressaltar que a totalidade dos casos registrados no país em um dado período pelo SINITOX é diferente da totalidade dos casos ocorridos no país neste mesmo período, porque, além do número de centros ser insuficiente para cobrir toda a extensão territorial do país, a notificação dos casos a esses centros é espontânea, sendo realizada pela própria vítima ou seus familiares com o objetivo de obter informação sobre como proceder e onde buscar atendimento, bem como por profissionais de saúde que buscam informações sobre o tratamento a ser realizado.

Os eventos de intoxicação dos trabalhadores ocorreram pela manipulação dos agrotóxicos, na preparação da mistura, na aplicação com bombas manuais e com tratores, dados estes que corroboram com os de Schneider (2011), no qual os sojicultores avaliados estavam envolvidos tanto na preparação da mistura dos agrotóxicos utilizados na lavoura, quanto na aplicação, a qual era realizada com tratores e bombas manuais. Chaves (2007) relatou que pessoas envolvidas na preparação e aplicação pela pulverização dos agrotóxicos são o grupo que mais sofre exposição devido à formação de aerossóis, que são constantemente inalados.

Tabela 6. Dados sócio-epidemiológicos dos trabalhadores ocupacionalmente expostos aos agrotóxicos.

Variáveis	N (%)
Idade	
<30	36 (30)
30-50	53 (45)
>50	30 (25)
Sexo	
Masculino	111 (93)
Feminino	9 (7)
Uso de EPIs	
Sim	62(52)
Não	58(48)
Função	
Aplicar	26 (22)
Manipular	8 (7)
Ambos	86 (71)
Eventos de Intoxicação	
Sim	50 (42)
Não	70 (58)
Tempo de exposição (anos)	
> 1	5 (4)
1 a 5	24 (21)
6 a 15	42 (37)
16 a 20	13 (11)
< 21	30 (27)

Ao comparar as características sócio-biológicas dos grupos caso e controle (Tabela 7), pode-se observar que não houve diferenças estatisticamente significativas entre a distribuição dos grupos quanto à idade, ao tabagismo e ao consumo de álcool [$p>0,05$].

Tabela 7. Características sócio-ambientais dos grupos exposto e controle.

Características	Número de Indivíduos		
	Caso n (%)	Controle n (%)	P
Idade em anos			
<30	36 (30)	23 (20)	0,33
30-50	53 (45)	45 (39)	
>50	30 (25)	47 (41)	
Sexo			
Masculino	111 (93)	97 (84)	0,08
Feminino	9 (7)	18 (16)	
Tabagismo			
Não	96 (80)	102 (89)	0,1
Sim	24 (20)	13 (11)	
Etilismo			
Não	44 (37)	40 (35)	0,87
Sim	76 (63)	75 (65)	

Para cada *primer* foi obtida uma curva de dissociação (*melting curve*), que valida os dados obtidos, com os seguintes valores de pico: 75°C para o *RH92600*, 78,5°C para o *GSTM1* e 83°C para o *GSTT1*, conforme ilustrado na Figura 9 abaixo.

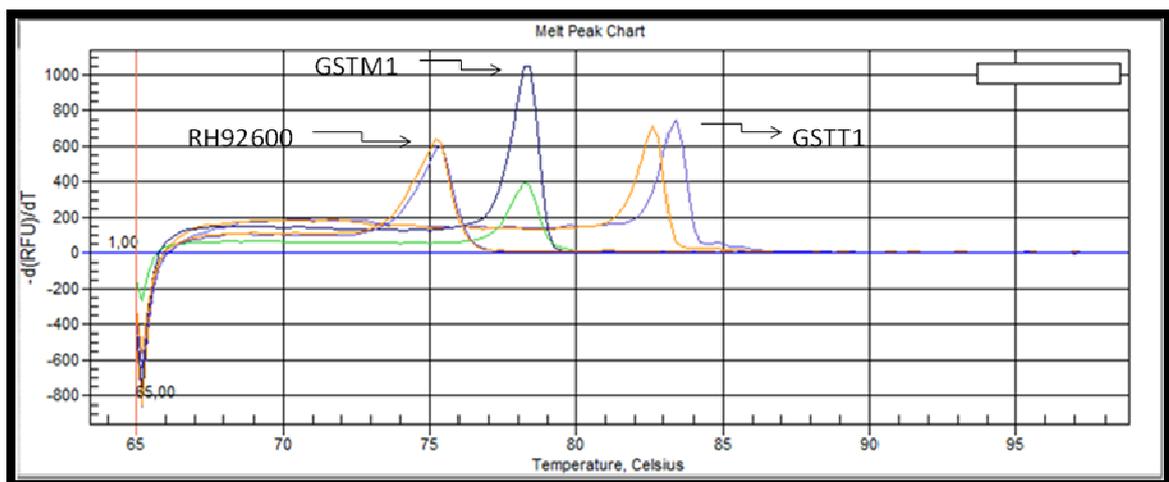


Figura 9. Curvas de *melting* dos *primers* *RH92600*, *GSTM1* e *GSTT1*, respectivamente, de 02 amostras do grupo exposto.

As frequências dos genótipos *GSTM1* e *GSTT1* dos grupos caso e controle estão demonstradas na tabela 8, não havendo diferenças estatisticamente significativas ($p \geq 0,05$) entre a distribuição genotípica. Dados também encontrados por Pinhel et. al. (2013) onde tanto a presença quanto a nulidade para *GSTT1* e *GSTM1* foram semelhantes em pacientes com doença de Parkinson e controles. A frequência do genótipo nulo para *GSTT1* e *GSTM1* na população da cidade do Rio de Janeiro é de 25,4% e 42,1% respectivamente, sendo descrita por Rossini et. al. (2002). Tais frequências assemelham-se às frequências encontradas nesse estudo, que foram de 18% e 49%, respectivamente, para os genótipos nulos de *GSTT1* e de *GSTM1* no grupo exposto a agrotóxicos e 18% e 37%, respectivamente, no grupo controle.

Tabela 8. Distribuição das frequências genotípicas dos grupos caso e controle.

	Caso (%)	Controle (%)	X ²	GL	P
<i>GSTT1</i>					
POSITIVO	99 (82)	95 (82)	0,0001	1	0,88
NULO	21 (18)	20 (18)			
TOTAL	120 (100)	115 (100)			
<i>GSTM1</i>					
POSITIVO	61(51)	73 (63)	3,8	1	0,07
NULO	59 (49)	42 (37)			
TOTAL	120 (100)	115 (100)			

As tabelas 9 e 10 ilustram a distribuição dos genótipos dos trabalhadores expostos e do grupo controle quanto aos dados sócio-epidemiológicos, como o consumo de álcool e cigarro. Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos caso e controle quanto à distribuição dos genótipos e o consumo de álcool e fumo ($p \geq 0,05$) e tais fatores não causaram incremento no risco de intoxicação aos agrotóxicos. Segundo Bustillos et al. (2012) a frequência do genótipo *GSTT1* nulo relacionada ao consumo de álcool foi um fato de risco significativo para trabalhadores expostos a pesticidas, aumentando em 1,47 vezes a probabilidade de pessoas com esse genótipo apresentarem danos genotóxicos. Como já relatado o genótipos nulos estão envolvidos na suscetibilidade ao risco de câncer e este risco está fortemente associado ao consumo de álcool e ao hábito de fumar que aumentam a carga de toxinas carcinogênicas (Duell et al., 2002).

Tabela 9. Distribuição dos genótipos de acordo com tabagismo.

	Não Fumantes (%)	Fumantes	X²	p
<i>GSTT1</i> positivo e <i>GSTM1</i> nulo	47(39)	8 (7)	0,79	0,85
<i>GSTT1</i> positivo e <i>GSTM1</i> positivo	52(43)	10(8)		
<i>GSTT1</i> nulo e <i>GSTM1</i> positivo	9(8)	1(0,8)		
<i>GSTT1</i> nulo e <i>GSTM1</i> nulo	12(10)	0(0)		

Tabela 10. Distribuição dos genótipos de acordo com o consumo de álcool.

	Não Etilistas	Etilistas	X²	p
<i>GSTT1</i> positivo e <i>GSTM1</i> nulo	47(39)	33(28)	0,7	0,87
<i>GSTT1</i> positivo e <i>GSTM1</i> positivo	52(43)	29(24)		
<i>GSTT1</i> nulo e <i>GSTM1</i> positivo	9(8)	5(4,2)		
<i>GSTT1</i> nulo e <i>GSTM1</i> nulo	12(10)	9(8)		

A tabela 11 demonstra a distribuição dos genótipos quanto ao tempo de exposição, uso de EPIs e eventos de intoxicação, no grupo ocupacionalmente exposto. Os trabalhadores que apresentaram maiores índices de intoxicação foram os que apresentaram genótipo *GSTT1* positivo e *GSTM1* positivo (16,6%), dos quais, 24,1% faziam uso de EPIs e tiveram um tempo de exposição médio de aproximadamente 17 anos. No entanto, não houve associação estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre tempo de exposição, uso de EPIs e eventos de intoxicação. Singh et al., (2011) sugeriram que o genótipos *GSTM1* e *GSTT1* nulos, juntamente com lesões no DNA, tem um importante papel na identificação de indivíduos com alto risco de desenvolver doenças, devido à exposição ocupacional a alguns pesticidas organofosforados. No entanto, no presente estudo, não houve um aumento no número de intoxicação para os genótipos nulos.

Tabela 11. Distribuição dos genótipos quanto ao tempo de exposição aos agrotóxicos, relatos de uso de EPIs e intoxicação, no grupo de trabalhadores expostos ocupacionalmente.

	Tempo de exposição (anos)	Uso de EPIs N (%)	Intoxicação N (%)
<i>GSTT1</i> positivo e <i>GSTMI</i> nulo	13,19	26 (21,66)	19 (15,83)
<i>GSTT1</i> positivo e <i>GSTMI</i> positivo	17,46	29(24,16)	20 (16,66)
<i>GSTT1</i> nulo e <i>GSTMI</i> positivo	17,66	3(2,5)	6 (5)
<i>GSTT1</i> nulo e <i>GSTMI</i> nulo	15,91	6(5)	5 (4,16)

A determinação dos polimorfismos é importante uma vez que vários polimorfismos de enzimas que metabolizam xenobióticos têm sido identificados por afetar os resultados de biomarcadores citogenéticos, já que são capazes de ativar ou inativar compostos potencialmente genotóxicos e carcinogênicos. A ativação metabólica e inativação de agentes genotóxicos ocorrem por enzimas de metabolização de Fase I e Fase II envolvendo múltiplas interações (Singh, et al., 2011).

A Fase I é mediada basicamente pelas enzimas citocromo P450. São elas que, geralmente, promovem a ativação de drogas e pró-carcinógenos para os intermediários eletrofílicos genotóxicos. Nesta fase, podem ser formados metabólitos reativos, altamente carcinogênicos, que são, por sua vez, biotransformados pelas enzimas inativadoras da Fase II, tais como as GSTs em compostos mais hidrossolúveis e fáceis de eliminar (Butler et al., 2011).

Além da ação contínua e direta dos xenobióticos anterior ao processo de sua eliminação, tanto a maior atividade das enzimas da Fase I quanto a baixa atividade das enzimas da Fase II podem gerar um acúmulo de metabólitos reativos. Estes, por sua vez, podem reagir com as macromoléculas da célula, tais como o DNA, formando os adutos de DNA, que, quando não reparados, podem causar mutações e iniciar o desenvolvimento do câncer. Portanto, a incapacidade de eliminar adequadamente produtos tóxicos pode contribuir para a maior susceptibilidade ao câncer (Safarinejad et al., 2011).

Indivíduos com a falta dos produtos dos genes *GSTMI* e *GSTT1* estão associados com aumento do risco de desenvolver câncer devido a processos de detoxificação deficientes. Vários estudos (Harada et al., 1992; Kelada et al., 2000; Abbas et. al., 2004; Bugano et al., 2008; Rouissi et al., 2009; Reis, 2011) demonstraram a importância dos polimorfismos dos genótipos *GSTT1* e *GSTMI* separadamente ou combinados, como parte do desenvolvimento de doenças. Segundo os dados de Kumar et al.(2012), indivíduos expostos a hidrocarbonetos aromáticos policíclicos com genótipos *GSTMI* nulos, apresentaram risco aumentado para o desenvolvimento de tumores de laringe, pulmão, bexiga, cólon e gastrointestinal e os indivíduos com genótipo nulo de *GSTT1*, possuem um risco aumentado para o desenvolvimento de tumores cerebrais e colo retais. Estes

achados indicam que os polimorfismos de *GSTM1* e *GSTT1* desempenham um papel importante na suscetibilidade humana aos agentes mutagênicos e carcinogênicos, sendo capazes de fornecer informações precoces, quanto ao risco do desenvolvimento de câncer na população.

Quanto a pesquisa de translocações $t(14;18)(q32,q21)$ em trabalhadores expostos a agrotóxicos que apresentaram genótipo nulo para *GSTM1* e/ou *GSTT1* e tinham tempo de exposição igual ou maior a 15 anos, foram analisadas 100 células (metáfases e interfases) para cada indivíduo. Apenas um indivíduo, dos 29 analisados, apresentou translocação para os cromossomos 14 e 18 (Figura 10) com uma frequência de 3%. Segundo as informações relatadas no questionário sócio-ambiental, o portador da translocação apresenta as seguintes características: sexo masculino; 40 anos; residente no município de Silvânia; não fumante; etilista; trabalha na cultura de soja, milho e feijão, com a função de manipular e aplicar agrotóxicos. Apresenta um tempo de exposição de 15 anos; usa EPIs; relatou eventos de intoxicações, com sintomas como: dor de cabeça, tontura, queimaduras e alteração da pele, tremores no corpo, indisposição, fraqueza e dores no corpo. Em nossa análise, esse indivíduo apresentou genótipo presente para *GSTT1* e nulo para *GSTM1*.

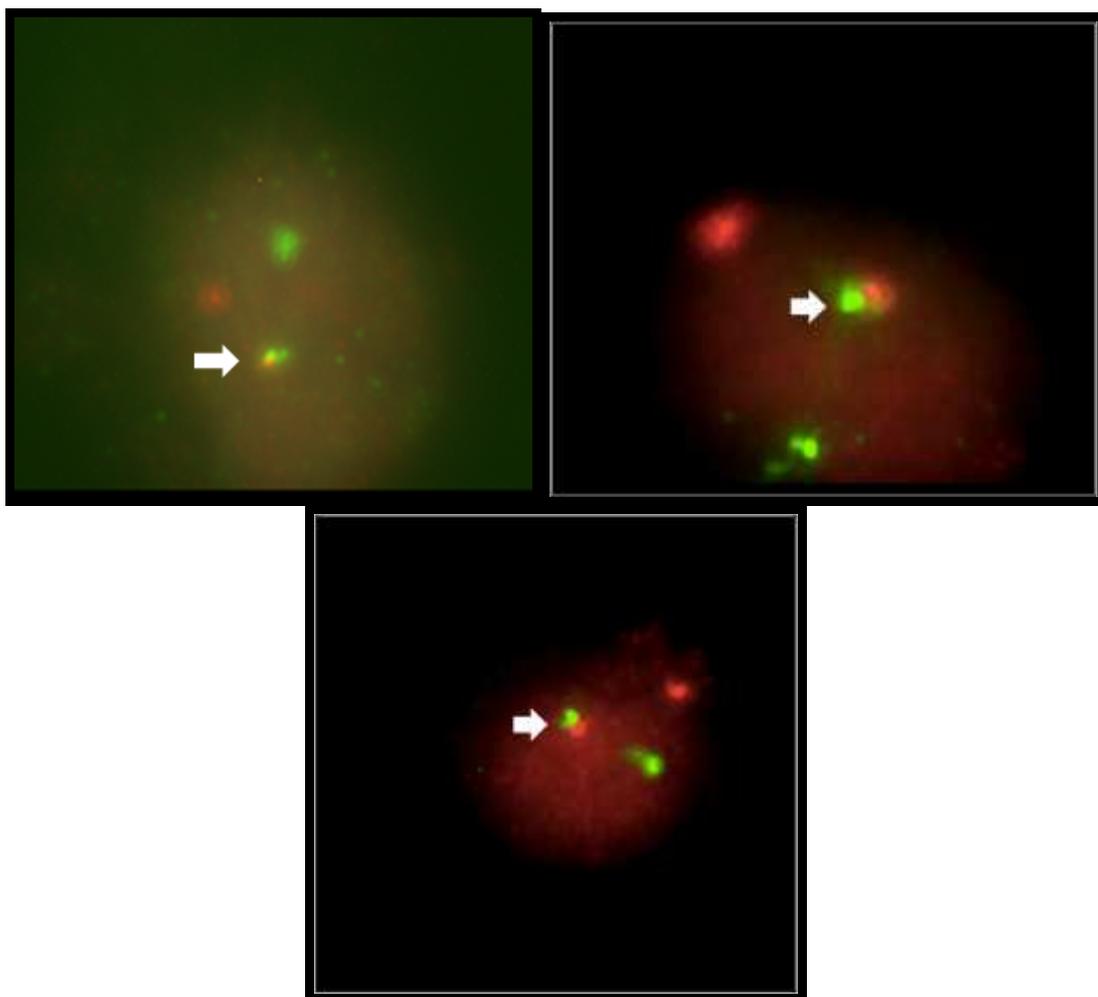


Figura 10. Translocações $t(14;18)(q32,q21)$ capturadas por microscopia motorizada epifluorescente e analisadas com software Isis® (setas indicando as translocações dos cromossomos 14 e 18).

A translocação t(14;18)(q32,q21) é encontrada em cerca de 90% dos indivíduos com linfomas foliculares e 20%-30% em linfomas difusos de células grandes. Esta aberração pode ser encarada como a alteração genética mais comum em neoplasias linfoides (Dolken et al., 2008). Entretanto, células com t(14;18)(q32,q21) positivas podem ser encontradas em até 60% de indivíduos saudáveis, e esses rearranjos encontrados são indistinguíveis daqueles encontrados em linfomas foliculares (Schuler et al., 2003).

Vários pesquisadores têm postulado que a prevalência e/ou frequência de t(14;18) em indivíduos saudáveis pode estar relacionada com a exposição ambiental a agentes cancerígenos (Fusco et al., 1996), pesticidas (Roulland et al., 2004) e tabagismo (Bell et al., 1995). Um risco mais elevado de t(14;18) foi encontrado em trabalhadores agrícolas que estiveram expostos a inseticidas e herbicidas (Chiu et al., 2006).

Dolken et al. (2008) investigaram 644 indivíduos saudáveis com diferentes faixas etárias em relação à translocação (14;18), 84 amostras de sangue de crianças <10 anos de idade, incluindo 36 amostras de sangue de cordão umbilical, foram negativos para a translocação t(14;18). Em crianças com idade entre 10 a 19 anos, observou-se uma prevalência de 19%. A partir dessa faixa etária, a prevalência só aumentou até os 50 anos de idade, onde se manteve estável em torno de 60% em todas as pessoas com idade mais avançada.

Dessa maneira, podemos inferir que a presença da translocação t(14;18)(q32,q21) encontrada no indivíduo estudado, pode ter sido causada pelo consumo de álcool, pela exposição prolongada a agrotóxicos, associada a perda progressiva do controle de reparo do sistema imune, que por sua vez está relacionado ao avanço da idade (Yasukawa et al., 2001).

6 CONCLUSÕES

A análise dos resultados desse estudo permitiu obter as seguintes conclusões:

- Não houve diferenças estatisticamente significativas entre as frequências dos genótipos *GSTM1* e *GSTT1*, dos grupos caso e controle;
- A associação entre os polimorfismos dos genes *GSTT1* e *GSTM1* e o consumo de álcool e tabaco, não demonstrou significância estatística, quando comparados os grupos caso e controle, sendo que tais fatores não causaram incremento no risco de intoxicação aos agrotóxicos;
- O uso de EPIs foi relatado por 52% dos trabalhadores ocupacionalmente expostos aos agrotóxicos;
- 42% dos trabalhadores rurais relataram eventos de intoxicação, cujos principais sintomas foram: náuseas, vômitos, dores de cabeça, tonturas, irritabilidade, desmaios e convulsões;
- Não houve associação estatisticamente significativa entre eventos de intoxicação, uso de EPIs e função dos trabalhadores (aplicação, manipulação ou ambos);
- Foi encontrado apenas um indivíduo com a presença da translocação t(14;18)(q32,q21) a qual pode ter sido causada pela exposição prolongada a agrotóxicos (15 anos).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.; DELVINQUIÈRE, K.; LECHEVREL, M.; LEBAILLY, P. et al. GSTM1, GSTT1, GSTP1 and CYP1A1 genetic polymorphisms and susceptibility to esophageal cancer in a French population: different pattern of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma. **World J Gastroenterol**, v. 10, n. 23, p. 3389-93, 2004.

ABDEL-RAHMAN SZ.; EL-ZEIN RA, ANWAR WA.; AU WW. A multiplex PCR procedure for polymorphic analysis of GSTM1 and GSTT1 genes in population studies. **Cancer Lett.**; 10: 229-233,1996.

ABHISHEK, S.; KAUR, N.; KAUR, S.; LATA, M. et al. Association of GSTM1 and GSTT1 gene deletions with susceptibility to DNA damage in the pesticide-exposed workers of Punjab. **Rejuvenation Research**, v. 13, n. 2-3, p. 281-284, 2010.

ABRASCO, Associação Brasileira de Saúde Coletiva. DOSSIÊ ABRASCO – **Uma alerta sobre os impactos dos Agrotóxicos na Saúde** ABRASCO, Rio de Janeiro, abril de 2012, 1a Parte.98p. Disponível em:<<http://www.abrasco.org.br/UserFiles/File/ABRASCODIVULGA/2012/DossieAGT.pdf>>. Acesso em : 13 de jan,2014, 20:50.

ALAVANJA M.C.R, HOPPIN J.A. & KAMEL F.Health effects of chronic pesticide exposure: cancer and neurotoxicity. **Annu. Rev. Public Health** 25:157-197,2004.

ANGERER, J.; EWERS, U.; WILHELM, M. Human biomonitoring: state of the art. **International journal of hygiene and environmental health**, v. 210, n. 3-4, p. 201-228, 2007.

ANVISA. Agrotóxico e toxicologia. Site ANVISA, 2011. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/anvisa/home/agrotoxicotoxicologia> >. Acesso em: 08/01/14

ARRUDA, V.R.; GRIGNOLI, C.E.; GONÇALVES, Prevalence of homozygosity for the deleted alleles of glutathione S-transferase *mu* (GSTM1) and *theta* (GSTT1) among distinct ethnic groups from Brazil: relevance to environmental carcinogenesis? **Clinical Genetics**,54:210-214,1998.

AYRES M, AYRES JR. M, AYRES DL, SANTOS AS. BioEstat: aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas. **Belém: Sociedade Civil Mamirauá**; 132-214 p.2007.

BAUMAN, J.G.J.; WIEGANT, J.; BORST, P.; DUIJN, P.A new method for microscopical localization of specific DNA sequences by *in situ* hybridization of fluorochrome-labelled RNA. **Experimental Cell Research**, v.128, p.485- 490, 1980.

BELL, D. A., LIU, Y., CORTOPASSI, G. A. Occurrence of bcl-2 oncogene translocation with increased frequency in the peripheral blood of heavy smokers.**J. Natl Cancer Inst.** n. 87. p. 223–224,1995.

BENEDETTI.D, NUNES.E, SARMENTO.M, PORTO.C, DIAS.J.F, SANTOS.C.E.I,BLAIR, A.; ZAHM S. H.; PEARCE, N. E.; HEINEMAN, E. F.; FRAUMENI, J. F. Clues to cancer etiology from studies of farmers. **Scandinavian Journal of Work, Environment & Health.** n. 18. Helsinque, p. 209-215,1992.

BOCHNER, R. Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas–SINITOX e as intoxicações humanas por agrotóxicos no Brasil. **Cien Saude Colet**, v. 12, n. 1, p. 73-89, 2007.

BOLOGNESI, C. Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 543, n. 3, p. 251-272, 2003.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Manual de Vigilância da Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos. Organização Pan-Americana de Saúde/Organização Mundial de Saúde. Brasília.1997.

BUCHARD, A.; SANCHEZ, J. J.; DALHOFF, K.; MORLING, N. et al. Multiplex PCR Detection of GSTM1, GSTT1, and GSTP1 Gene Variants: Simultaneously Detecting GSTM1 and GSTT1 Gene Copy Number and the Allelic Status of the GSTP1 Ile105Val Genetic Variant. **The Journal of molecular diagnostics: JMD**, v. 9, n. 5, p. 612, 2007.

BUFALO NE, LEITE JL, GUILHEN AC, MORARI EC, GRANJA F, ASSUMPCAO LV, WARD LS. Smoking and susceptibility to thyroid cancer: an inverse association with CYP1A1 allelic variants. **Endocr Relat Cancer.**; 13(4):1185-93,2006.

BUGANO, D.; CONFORTI-FROES, N.; YAMAGUCHI, N.; BARACAT, E. Genetic polymorphisms, the metabolism of estrogens and breast cancer: a review. **European journal of gynaecological oncology**, v. 29, n. 4, p. 313, 2008.

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

BURIM, R. V.; CANALLE, R.; MARTINELLI, A. L. C.; TAKAHASHI, C. S. Polymorphisms in glutathione S-transferases GSTM1, GSTT1 and GSTP1 and cytochromes P450 CYP2E1 and CYP1A1 and susceptibility to cirrhosis or pancreatitis in alcoholics. **Mutagenesis**, v. 19, n. 4, p. 291-298, 2004.

BUSTILLOS, N. T.; ASCARRUNZ, M. E.; AGUILAR, X.; RADA, A. Polimorfismos genéticos de la GSTM1 y GSTT1 como modificadores de riesgo mutagénico en agricultores bolivianos expuestos a plaguicidas. **BIOFARBO**, v. 20, n. 1, 2012.

BUTLER, M. W.; HACKETT, N. R.; SALIT, J.; STRULOVICI-BAREL, Y. et al. Glutathione S-transferase copy number variation alters lung gene expression. **European Respiratory Journal**, v. 38, n. 1, p. 15-28, 2011.

CALDERÓN-SEGURA, M. E.; GÓMEZ-ARROYO, S.; VILLALOBOS-PIETRINI, R.; MARTÍNEZ-VALENZUELA, C. et al. Evaluation of Genotoxic and Cytotoxic Effects in Human Peripheral Blood Lymphocytes Exposed In Vitro to Neonicotinoid Insecticides News. **Journal of Toxicology**, v. 2012, 2012.

CARNEIRO, F. F. P., W; RIGOTTO, R M; AUGUSTO, L G S. RIZZOLO, A; MULLER, N M; 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.

CARVALHO, C.A.M.C. Aplicação médico-legal da PCR em tempo real na caracterização de SNPs. Tese de Mestrado, Faculdade de Medicina da Universidade do Porto. Porto, 75 pp.2007.

CERRONI L., WIESNER T.. Linfomas cutâneos: de lamorfología a latecnología de microprocesador. **ActasDermo-Sifiliográficas** Volume 100, Supplement 1, November, p.3–17, 2009.

CHANG XIN S., L.H., LIN X., YIRONG L. The detection of circulating tumor cells of breast cancer patients by using multimarker (Survivin, hTERT and hMAM) quantitative real-time PCR. **Clinical Biochemistry** 42, 194-200, (2010).

CHAVES, T. V. S. Dissertação: Avaliação do impacto do uso de agrotóxicos nos trabalhadores rurais dos municípios de ribeiro gonçalves, baixa grande do ribeiro e uruçuí – piauí. Fortaleza, 2007

CHIU, B. C.; DAVE, B. J.; BLAIR, A.; GAPSTUR, S. M.; ZAHM, S. H.; WEISENBURGER, D. D. Agricultural pesticide use and risk of t(14;18)-defined subtypes of non-Hodgkin lymphoma. **Blood**. v. 108 n. 4. Washington, DC: American Society of Hematology,. p. 1363-1369.2006.

COLOSSO C, Tiramani M & Maroni M. Neurobehavioral effects of pesticides: state of the art. **Neurotoxicology** 24:577-591, 2003.

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da Safra** Disponível:<http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_04_11_15_04_18_boletim_abril_2012.pdf>. Acesso em: 13 jan, 2014, 21:56.

CORREIA, F.L.A. Desenho e montagem de método rápido para diagnóstico da Borreliose de Lyme por PCR em tempo real. Tese de Mestrado, Universidade Fernando Pessoa. Porto, 70 pp.2007.

DE OLIVEIRA HIRAGI, C.; MIRANDA-VILELA, A. L.; ROCHA, D. M. S.; DE OLIVEIRA, S. F. et al. Superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glutathione S-transferases M1 and T1 gene polymorphisms in three Brazilian population groups. **Genetics and molecular biology**, v. 34, n. 1, p. 11-18, 2011.

DOLKEN, G.; DOLKEN, L.; HIRT, C.; FUSH, C.; RABKIN, C. S.; SCHULER, F. Agedependent prevalence and frequency of circulating t(14;18)-positive cells in the peripheral blood of healthy individuals. **Journal of the National Cancer Institute Monographs**.n. 39. Oxford: Oxford University Press, p. 44-47.2008.

DUARTE RLM & PASCHOAL MEM. Marcadores moleculares no câncer de pulmão: papel prognóstico e sua relação com o tabagismo. **J. Bras. Pneumol.** 32 (1): 56-65.2005.

DUELL, E. J.; HOLLY, E. A.; BRACCI, P. M.; LIU, M. et al. A population-based, case–control study of polymorphisms in carcinogen-metabolizing genes, smoking, and pancreatic adenocarcinoma risk. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 94, n. 4, p. 297-306, 2002.

ESPY, M.J., UHL, J.R., SLOAN, L.M., BUCKWALTER, S.P., JONES, M.F., VETTER, E.A., YAO, J.D.C., WENGENACK, N.L., ROSENBLATT, J.E., COCKERILL, F.R., SMITH, T.F. Real-Time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. **Clinical Microbiology Reviews** 19,165–256.2006.

EVANS P.A.S., BASTARD C., DELABESSE E., MACINTYRE E.A., WIJERS- KOSTER P., SCHUURIG E., MOREAU E., GONZÁLEZ D., MILLS K.I., JENNINGS B.A., MILNER B.J., BLOXHAM D., STAROSTIK P., DELFAU-LARUE M.H., OTT M., SALLES G., MORGAN G.J.; **t(14;18) with BCL2-IGH rearrangement**. *Leukemia* 17, 2298-2301, 2003.

FRESHNEY, R. I. **Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique**. 4. ed. Nova York: Wiley-Liss, 397 p.1994.

FUSCOE, J. C.; SETZER, R. W.; COLLARD, D. D.; MOORE, M. M. Quantification of t(14;18) in the lymphocytes of healthy adult humans as a possible biomarker for environmental exposure to carcinogens. **Carcinogenesis**. v. 17, n. 5. Oxford: Oxford University Press, p. 1013-1020.1996.

GALL, J.G.; PARDUE, M.L. Formation and detection of RNADNA hybrid molecules in cytological preparations.**Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.63, p.378-383, 1969.

GARCIA, E. G. **Segurança e saúde no trabalho rural: a questão dos agrotóxicos**. 2001.

GATEVA, S.; VARADINOVA, E.; GEORGIEVA, V. Genotoxic Activity of the Pesticide Devrinol in Human Lymphocytes in vitro.**Comptes Rendus de l'Academie Bulgare des Sciences**, v. 54, n. 2, p. 81, 2001.

GILMAN, Goodman. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 9. ed. Rio de Janeiro: MacGrawHill, 2006.

GRIFFITHS, A. J. F.; LEWONTIN, R. C.; CARROLL S. B.; WESSLER S. R. **Introdução à Genética**. Guanabara Koogan, 10^a Ed. 2013

HARADA, S.; MISAWA, S.; NAKAMURA, T.; TANAKA, N. et al. Detection of GST1 gene deletion by the polymerase chain reaction and its possible correlation with stomach cancer in Japanese. **Human genetics**, v. 90, n. 1, p. 62-64, 1992.

HATAGIMA, A.; KLAUTAU-GUIMARÃES, M. N.; SILVA, F. P.; CABELLO, P. H. Glutathione S-transferase M1 (GSTM1) polymorphism in two Brazilian populations. **Genetics and molecular biology**, v. 23, n. 4, p. 709-713, 2002.

HEID. C.A., S., J., LIVAK, K.J., WILLIAMS, P.M.. Real time quantitative PCR. **Genome Research** 6, 986-994,1996.

HIGUCHI, R., FOCKLER, C., DOLLINGER, G., WATSON, R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. **Biotechnology Nature Publishing Company** 11, 1026-1030.1993.

HOLLAND, N., BOLOGNESI, C., KIRSCH-VOLDERS, M., BONASSI, S., ZEIGER, E., KNASMUELLER, S. & FENECH, M.The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: The HUMN project perspective on current status and knowledge gaps.**Mutation Research**,659(1-2):93-108, 2008.

JACOBSON,L.S.V;HACON,S.S;ALVARENGA.L;GOLDSTEIN,R.A;GUMS,C;BUSS,D.F;LEDA ,L.R.Comunidade pomerana e uso de agrotóxicos:uma realidade pouco conhecida. **Ciência e Saúde Coletiva**,14(6): 2239-2249,2009.

JONG D.; Molecular Pathogenesis of Follicular Lymphoma: A Cross Talk of Genetic and Immunologic Factors. **Journal of Clinical Oncology**, (23) 26: 6358-6363, 2005.

- KELADA, S. N.; KARDIA, S. L. R.; WALKER, A. H.; WEIN, A. J. et al. The Glutathione S-Transferase- μ and- θ Genotypes in the Etiology of Prostate Cancer: Genotype-Environment Interactions with Smoking. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 9, n. 12, p. 1329-1334, 2000.
- KLUG, W. S.; CUMMINGS, M. R.; SPENCER, C. A.; PALLADINO, M. A. Conceitos de Genética – 9ª Edição, Artmed, 2010.
- KUBISTA, M., ANDRADE, J.M., BENGTSSON, M., FOROOTAN, A., JONÁK, J., LIND, K., SINDELKA, R., SJÖBACK, R., SJÖGREEN, B., STRÖMBOM, L., STÅHLBERG, A., ZORIC, N. The real-time polymerase chain reaction. **Molecular Aspects of Medicine** 27, 95-125, 2006.
- KUMAR, A.; YADAV, A.; GIRI, S. K.; DEV, K. et al. Allelic variation of GSTM1 and GSTT1 genes in Haryana population. **Genomic Medicine, Biomarkers, and Health Sciences**, 2012.
- KUMAR, R.; DAS, B.C. Role of environmental factors in carcinogenesis. **Environment & We an International Journal of Science & Technology**, 4, 53-59, 2009.
- KVITKO, K.; BANDINELLI, E.; HENRIQUES, J. A. P.; HEUSER, V. D. et al. Susceptibility to DNA damage in workers occupationally exposed to pesticides, to tannery chemicals and to coal dust during mining. **Genetics and molecular biology**, v. 35, n. 4, p. 1060-1068, 2012.
- LEVSKY, J.M.; SINGER, R.H. Fluorescence in situ hybridization: past, present and Future. **Journal of Cell Science**, v. 116, p. 2833-2838, 2003.
- LUBIN, J. H.; BOICE JR, J. D. Lung cancer risk from residential radon: meta-analysis of eight epidemiologic studies. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 89, n. 1, p. 49-57, 1997.
- MACHADO I.; ILLUECA C.; GARCÍA-CASADO Z.; LÓPEZ-GUERRERO J.; LORENTE P; LAVERNIA J. Linfoma de Hodgkin con presencia de t(14;18) en paciente con antecedentes de linfoma foliolar. **Revista Española de Patología** Volume 46, Issue 2, April–June p. 106–111, 2013.
- MACKAY, I. M., MACKAY, J.F., NISSEN, M.D., SLOOTS, T.P. Real-time PCR: History and Fluorogenic Chemistries in Mackay, p.1-40, I.M. (Ed.), Real-Time PCR in Microbiology, From Diagnosis to Characterization. **Caister Academic Press** Norfolk, UK, 2007.
- MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Brasil Projeções do Agronegócio 2010/2011 a 2020/2021**, Assessoria De Gestão Estratégica Brasília, 2012. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Ministerio/gestao/projecao/PROJECOES%20DO%20AGRONEGOCIO%202010-11%20a%202020-21%20-%20_0.pdf> Acesso em 10 jan, 2014, 21:15
- MASIR N, CAMPBELL LJ, GOFF LK, JONES M, MARAFIOTI T, CORDELL J, BCL2 protein expression in follicular lymphomas with t(14;18) chromosomal translocations. **Br J Haematol.**;144:716–25.2009.
- NAGEM, A. F. S. R. Dissertação: Avaliação Do Risco Ocupacional De Trabalhadores Expostos A Agrotóxicos No Município De Touros/Rio Grande Do Norte. Natal, 2013.
- NEVES S.M.N.; GUEDES R.M.C. Arq. Inst. Biol., São Paulo, v.79, n.4, p.627-632, out./dez., 2012

NIWA, O. Indirect mechanisms of genomic instability and the biological significance of mutations at tandem repeat loci. **Mutation research**. n. 598. Amsterdã: Elsevier, p.61-72. 2006.

NOVATO-SILVA. et al. A study of immunological alterations in rural workers laboriously exposed to pesticides. In: congresso mundial sobre segurança e saúde no trabalho, 15, São Paulo, 1999.

OLIVEIRA, T. M. D. S. PCR em tempo real: métodos e aplicações. Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro, 2010.

OMS (Organização Mundial da Saúde). Public Health Impact of Pesticides Used in Agriculture. Genebra: **The World Health Organization**, 2010.

PELT-VERKUIL, E., VAN BELKUM, A., HAYS, J.P. Principles and technical aspects of PCR amplification, **Springer**, 332 pp. 2008.

PERES, F.; MOREIRA, J. C. Saúde e ambiente em sua relação com o consumo de agrotóxicos em um pólo agrícola do Estado do Rio de Janeiro, Brasil Health, environment, and pesticide use in a farming area in Rio de Janeiro State, Brazil. **Cad. Saúde Pública**, v. 23, n. Sup 4, p. S612-S621, 2007.

PIGNATI, W. A.; MACHADO, J. M. H.; CABRAL, J. F. Acidente rural ampliado: o caso das “chuvas” de agrotóxicos sobre a cidade de Lucas do Rio Verde – MT. **Ciência-saúde coletiva**, Rio de Janeiro. 2007.

PINHEL, M. A. S.; SADO, C. L.; LONGO, G. S.; GREGÓRIO, M. L.; AMORIM G. S.; FLORIM G. M. S.; MAZETI C. M.; MARTINS D. P.; OLIVEIRA, F. N.; NAKAZONE, M. A.; TOGNOLA W. A.; SOUZA D. R. S. Nullity of GSTT1/GSTM1 related to pesticides is associated with Parkinson's disease. **Arq Neuropsiquiatr** 71(8):527-532, 2013.

PLOEG, M. Cytochemical nucleic acid research during the twentieth century. **European Journal of Histochemistry**, v.44, p.7-42, 2000.

RADIS Comunicação em Saúde, **Agrotóxicos Proteção para quem?** Manguinhos Rio de Janeiro, RJ No 95 Julho de 2010, Disponível em: <http://www4.ensp.fiocruz.br/radis/95/pdf/radis_95.pdf> Acesso em 08 jan 2014, 22h38min.

REIS, A. A. S. Estudo da associação do polimorfismo genético em carcinomas da tireóide. **Revista de Biologia Neotropical**, v. 7, n. 1, p. 61-62, 2011.

RIBEIRO, L. R., Ed. Toxicologia Genética Mutagenese Ambiental.: SBMCTA, v.1ª edição, 2003.

RIBEIRO, M. L.; LOURENCETTI, C.; POLESE, L.; NAVICKIENE, S. et al. Pesticidas: Usos e Riscos para o Meio Ambiente. **Holos Environment**, v. 8, n. 1, p. 53-71, 2009.

ROSSINI, A.; RAPOZO, D. C. M.; AMORIM, L. M. F.; MACEDO, J. M. B. et al. Frequencies of GSTM1, GSTT1, and GSTP1 polymorphisms in a Brazilian population. **Genet Mol Res**, v. 1, n. 3, p. 233-40, 2002.

ROUISSI, K.; OUERHANI, S.; MARRAKCHI, R.; SLAMA, M. R. B. et al. Combined effect of smoking and inherited polymorphisms in arylamine N-acetyltransferase 2, glutathione S-transferases M1 and T1 on bladder cancer in a Tunisian population. **Cancer genetics and cytogenetics**, v. 190, n. 2, p. 101-107, 2009.

ROULLAND, S.; LEBAILLY P.; ROUSSEL, G.; BRIAND M.; CAPPELLEN D.; POTTIER, D.; HARDOUIN, A.; TROUSSARD, X.; BASTARD, C.; HENRY-AMAR, M.; GAUDUCHON, P. BCL-2/JH translocation in peripheral blood lymphocytes of unexposed individuals: lack of seasonal variations in frequency and molecular features. **International Journal of Cancer**. v. 104. Heidelberg, Alemanha: German Cancer Research Center, 2003.

SAFARINEJAD, M. R.; SAFARINEJAD, S.; SHAFIEI, N.; SAFARINEJAD, S. Association of genetic polymorphism of glutathione S-transferase (GSTM1, GSTT1, GSTP1) with bladder cancer susceptibility. **Urologic oncology**, 2011.

SCHNEIDER, N. B. Avaliação de polimorfismo de genes de metabolização GSTT1, GSTM1, GSTP1 e PON1 na suscetibilidade individual a danos de DNA em sojicultores de Espumoso-RS. 2011.

SCHÜLER, F.; HIRT, C.; DÖLKEN, G. Chromosomal translocation t(14;18) in healthy individuals. **Seminars in Cancer Biology**.v. 13. Amsterdã: Elsevier, 2003.

SILVA, J. M. et al. Agrotóxico e trabalho: uma combinação perigosa para a saúde do trabalhador rural. **Revista de Ciência e Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 4, p. 891-903, 2005.

SILVA.J. Genetic damage in soybean workers exposed to pesticides: evaluation with the comet and buccal micronucleus cytome assays.**Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**. 2013.

SINDAG – **Mercado de defensivos**. Câmara Temática de Insumos Agropecuários Janeiro a outubro/2011.Disponível em:<http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/camaras_tematicas/Insumos_agropecuarios/57RO/App_Defensivos.pdf Acesso em 08 jan, 2014, 21:46.

SINGH, S.; KUMAR, V.; SINGH, P.; THAKUR, S. et al. Genetic polymorphisms of GSTM1, GSTT1 and GSTP1 and susceptibility to DNA damage in workers occupationally exposed to organophosphate pesticides. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 725, n. 1–2, p. 36-42, 2011.

SINITOX. Notificações de Intoxicações no Brasil - 2011. 2011. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/sinitox_novo/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=386>. Acesso em: 30/01/14.

SOARES, W.; ALMEIDA, R. M. V. R; MORO, S. Trabalho rural e fatores de risco associados ao regime de uso de agrotóxicos em Minas Gerais, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 4, p. 1117-1127, 2003.

SOLDINI D., C. MONTAGNA, P. SCHÜFFLER, V. MARTIN, A. GEORGIS, T. THIESLER, A. CURIONI-FONTECEDRO, P. WENT, G. BOSSHARD, S. DEHLER, L. MAZZUCHELLI, AND M. TINGUELY. A new diagnostic algorithm for Burkitt and diffuse large B-cell lymphomas based on the expression of CSE1L and STAT3 and on MYC rearrangement predicts outcome.**Ann Oncol** (2013) 24 (1): 193-201 first published online September 11, 2012

SPRENGER, R; SCHLAGENHAUFER, R; KERB, R; BRUHN, C; BROCKMOLLER, J, ROOTS, I; BRINKMANN, U. Characterization of glutathione S-transferase GSTT1 deletion: discrimination of all genotypes by polymerase chain reaction indicates a trimodular genotype phenotype correlation. **Pharmacogenetics**; 10: 557-565.2000.

SWINGER R.R.; TUCKER J.D. Fluorescence *in situ* hybridization: a brief review. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.27, p.245-254, 1996.

THOMPSON, J. S.; THOMPSON, M.W. **Genética Médica**.Elsevier, 2008.

VERMA, R.S.; BABU, A. Human Chromosomes: Manual of Basic Techniques. São Paulo: Pergamon, 1989.

VOLPI, E.V.; BRIDGER, J.M. FISH glossary: an overview of the fluorescence in situ hybridization technique. **BioTechniques**, v.45, p.385-409, 2008.

WATSON, J. D. *et al.* **Recombinant DNA: Genes and genomes: a short course**. 3rd ed. New York: W. H. Freeman and Company, 2007.

WESTMAN, J. A. **Genética médica**.Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2006.

YASUKAWA, M.; BANDO, S.; DÖLKEN, G.; SADA, E.; YAKUSHIJIN, Y.; FUJITA, S.; MAKINO, H. Low frequency of BCL-2/JH translocation in peripheral blood lymphocytes of healthy japanese individuals. **Blood**. v. 98. n. 2. Washington, DC: American Society of Hematology, 2001.

YOUNG K.S. Clinical significance of cytogenetic aberrations in bone marrow of patients with diffuse large B-cell lymphoma: prognostic significance and relevance to histologic involvement.**Journal of Hematology & Oncology** 6, 2013.

ZHANG, F., Immunophenotypic features and t(14;18) (q32;q21) translocation of Chinese follicular lymphomas helps to distinguish subgroups.**Diagnostic Pathology** 8, 154. 2013.

ANEXO 1- COMITE DE ÉTICA



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

Av. Universitária, 1069 • Setor Universitário
Caixa Postal 86 • CEP 74605-010
Goiânia • Goiás • Brasil
Fone: (62) 3946.1070 • Fax: (62) 3946.1070
www.pucgoias.edu.br • prope@pucgoias.edu.br

Registro CEP 1978/2011

DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que o Projeto **Estudos estocásticos da exposição ocupacional a pesticidas em municípios goianos com intensa atividade agrícola**, coordenado pelo (a) pesquisador (a) **Carolinne Borges Khayat**. Foi cadastrado no Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica de Goiás (CEP-SGC/PUC Goiás) sob o **CAAE 0179.0.168.000-11**, em 28/10/2011 e **aprovado** em 29/02/2012.

- CEP-SGC/PUC Goiás pode, a qualquer momento, fazer escolha aleatória de estudo em desenvolvimento para avaliação e verificação do cumprimento das normas da Resolução 196/96 (Manual Operacional Para Comitês de Ética em Pesquisa – item 13).
- Informamos que é obrigatória a entrega do relatório de acompanhamento da pesquisa, conforme a categoria de pesquisa realizada, em cumprimento da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde.
- Modelo do relatório de acompanhamento da pesquisa se encontra no site do Comitê de Ética <http://www.pucgoias.edu.br/cep> - modelos documentos.

Categorias de pesquisa

TCC: Final da pesquisa
Especialização: Final da pesquisa
Mestrado: Relatório anual e final
Doutorado: Relatório anual e final
Outros: Relatório anual e final

Rodrigues
Prof. Dr. José Rodrigues do Carmo Filho
Coordenador do CEP-SGC/PUC Goiás

Goiânia, 29 de Fevereiro de 2012.

ANEXO II**PROTOCOLO DE FISH – IGH/BCL2 TRANSLOCATION AQUARIUS CYTOCELL
(MODIFICADO)**Preparo de soluções**Álcool 70%**

35ml álcool absoluto + 15 água = 50ml

Álcool 85%

42,5 álcool absoluto + 7,5 água = 50ml

Solução 1

0,04 SSC (1ml 20xSSC + 49ml água)

Solução 2

2xSSC 0,05% Tween (5ml 20xSSC + 45ml água + 25ul de Tween 20)

Objetivo: Detecção de segmentos específicos de DNA

1ª Etapa: Preparação da lâmina para codenaturação

- 1- Escolhe-se uma região na lâmina (já preparada conforme citogenética convencional), onde se encontre material apropriado para a reação, preferencialmente regiões onde se encontre vários núcleos interfásicos e com metáfase.
 - 2- Marca-se a região escolhida no mapa. Armazena as lâminas em geladeira (2-8°C) overnight.
 - 3- Efetuar desidratação da lâmina, passando-a pelas seguintes soluções:
 - a. Álcool 70% por 1 minuto
 - b. Álcool 85% por 1 minuto
 - c. Álcool 100% por 1 minuto
 - 4- Deixa a lâmina secar.
 - 5- Aplicar a sonda na região demarcada anteriormente (2ul).
 - 6- Cobre-se a sonda com lamínula 24x24m, limpa e desengordurada. A partir da aplicação da sonda a lâmina deve ficar protegida da luz.
 - 7- Hibridação: coloca-se a lâmina no hibridizador (Hybrite) obedecendo a seguinte programação:
 - a. Desnaturação por 3 minutos a 75°C
 - b. Anelamento por 22 horas a 37°C
- Obs: colocar água nas laterais do Hybrite.

2ª Etapa: Lavagem e aplicação da contracoloração

- 1- Preparar as soluções de lavagem.
- 2- Ajustar a temperatura do banho-maria em 72°C (para colocar a solução 1) e colocar as soluções de lavagem em um Falcon 50ml.
- 3- Retirar a lâmina do hibridizador ao abrigo da luz.
- 4- Retira-se a lamínula arrastando-a com a pinça e mergulha na solução 1 por 2 minutos.
- 5- Retira-se a lâmina, deixa escorrer o excesso e então mergulha na solução 2 por 1 minuto.
- 6- Deixa secar a lâmina.
- 7- Aplicar 10ul do contracorante (DAPI).
- 8- Cobrir a gota com lamínula evitando o aparecimento de bolhas.
- 9- Aguardar por 10 minutos.
- 10- Capturar as imagens.

APÊNDICE I

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Dados de identificação

Título do Projeto: Avaliação Citogenética e Molecular de Indivíduos Ocupacionalmente Expostos aos Agrotóxicos

Pesquisadores Responsáveis: Mariana Pedrosa Batista e Daniela de Melo e Silva

Eu, _____,
RG nº _____, Nacionalidade _____ Idade _____,
Endereço _____ estou sendo convidado a participar de um estudo denominado: **Avaliação Citogenética e Molecular de Indivíduos Ocupacionalmente Expostos aos Agrotóxicos**, cujos objetivos e justificativas são: realizar um estudo genético-molecular de trabalhadores agrícolas de municípios goianos, expostos ocupacionalmente a pesticidas, avaliando os efeitos dessa exposição, a fim de verificar prováveis alterações genéticas, analisando também o tempo e os tipos de agrotóxicos mais utilizados pelos trabalhadores. Para isso serão coletados, 15,0 ml de sangue, com material descartável, o qual será armazenado em isopor com gelo e depois das análises, será descartado. O presente estudo contribuirá para se compreender os riscos à saúde humana devidos à exposição individual, reforçando a necessidade do trabalhador em utilizar os equipamentos de segurança durante o uso dos agrotóxicos. Estes equipamentos visam a proteção contra o desenvolvimento das doenças relacionadas ao trabalho. Após a realização dos testes laboratoriais, você receberá todos os resultados em casa, os quais serão encaminhados, pessoalmente, pelas pesquisadoras responsáveis.

A minha participação no referido estudo será no sentido de doar voluntariamente, uma amostra de sangue, para colaborar com a investigação da exposição a pesticidas, verificando possíveis danos ao DNA e alterações genéticas.

Recebi, por outro lado, os esclarecimentos necessários sobre os possíveis desconfortos e riscos decorrentes do estudo, levando-se em conta que é uma pesquisa, e os resultados positivos ou negativos somente serão obtidos após a sua realização. Durante a coleta de sangue você poderá sentir uma dor leve a moderado, em decorrência da aplicação da agulha, podem também ocorrer a formação de hematomas que não são incomuns, caso isso ocorra, você será imediatamente encaminhado (a) ao Serviço Médico mais próximo, ou caso seja necessário, o SAMU ou uma ambulância local será contactada.

Estou ciente de que minha privacidade será respeitada, ou seja, meu nome ou qualquer outro dado ou elemento que possa, de qualquer forma, me identificar, será mantido em sigilo, assim como minha confidencialidade. Dessa forma, minha identificação jamais será conhecida.

Também fui informado de que posso me recusar a participar do estudo, ou retirar meu consentimento a qualquer momento, sem precisar justificar, e de, por desejar sair da pesquisa, não sofrerei qualquer prejuízo à assistência que venho recebendo.

Os pesquisadores envolvidos com o referido projeto são: Mariana Pedrosa Batista e Daniela de Melo e Silva, e com eles poderei manter contato pelos telefones: (62) 84881232 (Mariana) e (62) 99549691 (Daniela).

É assegurada a minha assistência durante toda pesquisa, bem como me é garantido o livre acesso a todas as informações e esclarecimentos adicionais sobre o estudo e suas consequências, enfim, tudo o que eu queira saber antes, durante e depois da minha participação.

Enfim, tendo sido orientado quanto ao teor de todo o aqui mencionado e compreendido a natureza e o objetivo do já referido estudo, manifesto meu livre consentimento em participar, estando totalmente ciente de que não há nenhum valor econômico, a receber ou a pagar. No entanto, caso eu tenha qualquer despesa decorrente da participação na pesquisa, haverá ressarcimento na forma de dinheiro em espécie. De igual maneira, caso ocorra algum dano decorrente da minha participação no estudo, serei devidamente indenizado, conforme determina a lei.

Goiânia, ___ de _____ de _____

Nome e Assinatura do sujeito da pesquisa

APÊNDICE II

**AVALIAÇÃO CITOGÊNÉTICA E MOLECULAR DE INDIVÍDUOS
OCUPACIONALMENTE EXPOSTOS AOS AGROTÓXICOS**

Questionário

- 1) Nome: _____
- 2) Sexo: () F () M
- 3) Idade:
- 4) Fumante: () Sim () Não Em caso afirmativo, fuma por quanto tempo e quantos cigarros por dia?
- 5) Uso de bebida alcoólica? () Sim () Não. Em caso afirmativo, qual tipo de bebida e qual frequência?
- 6) Problemas de saúde: () Sim () Não
- 7) Qual (is) e quando manifestou:
- 8) Estado Civil: () Solteiro(a) () Casado(a) () Separado(a) () Viúvo(a)
- 9) Filhos: () Sim () Não Quantos:
- 10) Saudáveis: () Sim () Não
- 11) Atividade agrícola principal:
- 12) Tempo de atividade agrícola:
- 13) Qual(is) cultura(s) produzida(s):
- 14) Uso de agrotóxicos: () Sim () Não
- 15) Qual(is) agrotóxico(s) utilizado(s):
- 16) Manipula e/ou aplica o agrotóxico?
- 17) Há quanto tempo manipula/aplica agrotóxicos:
- 18) Frequência na manipulação/aplicação de agrotóxicos:
() Uma vez por semana () A cada 15 dias () Uma vez por mês
- 18) Qual o tipo de equipamento usado para manipulação/aplicação de agrotóxico:
- 19) Como os agrotóxicos são armazenados:
- 20) Local de armazenamento:
- 21) Uso de vestimenta adequada para manipulação de agrotóxicos: () Sim () Não
- 22) Principais itens de vestuário usados:
() Bota () Máscara () Luva () Boné ou Chapéu () Calça
() Bermuda () Camisa de manga
- 23) Conhecimento sobre EPI: () Sim () Não
- 24) Relatos sobre eventos de intoxicação: () Sim () Não
() Dor de cabeça () Náuseas () Vômitos () Tonturas
() Queimaduras e alterações da pele () Desmaios
() Irritação de nariz, garganta e olhos, provocando tosse e lágrimas
() Falas com frases desconexas () Tremores no corpo
() Irritação ou Nervosismo () Indisposição, fraqueza e mal estar
() Vertigem e alterações na visão () Salivação e sudorese aumentadas
() Convulsões () Dores no corpo, principalmente braços, pernas e peito
() Outros. Especificar:

Pesquisadoras Responsáveis: Mariana Pedrosa Batista
Daniela de Melo e Silva