



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE MESTRADO EM GENÉTICA
NÚCLEO DE PESQUISAS REPLICON

**AVALIAÇÃO DE DANOS GENÉTICOS E CORRELAÇÃO COM
POLIMORFISMOS NOS GENES *GSTM1* E *GSTT1* EM TRABALHADORES
OCUPACIONALMENTE EXPOSTOS A AGROTÓXICOS EM MUNICÍPIOS
GOIANOS COM INTENSA ATIVIDADE AGRÍCOLA**

Goiânia, fevereiro de 2014.



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE MESTRADO EM GENÉTICA
NÚCLEO DE PESQUISAS REPLICON

**AVALIAÇÃO DE DANOS GENÉTICOS E CORRELAÇÃO COM
POLIMORFISMOS NOS GENES *GSTM1* E *GSTT1* EM TRABALHADORES
OCUPACIONALMENTE EXPOSTOS A AGROTÓXICOS EM MUNICÍPIOS
GOIANOS COM INTENSA ATIVIDADE AGRÍCOLA**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Genética da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Mestranda: Wanessa Fernandes Carvalho

Orientadora: Profa. Dra. Daniela de Melo e Silva

Goiânia, fevereiro de 2014.

Dados Internacionais de Catalogação da Publicação (CIP)

(Sistema de Bibliotecas PUC Goiás)

Carvalho, Wanessa Fernandes.

C331a Avaliação de danos genéticos e correlação com polimorfismos nos genes *gstm1* e *gstt1* em trabalhadores ocupacionalmente expostos a agrotóxicos em municípios goianos com intensa atividade agrícola [manuscrito] / Wanessa Fernandes Carvalho. – 2013.

88 f. : il.; grafs.; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Programa de Mestrado em Genética, 2013.

“Orientadora: Profa. Dra Daniela de Melo e Silva”.

Bibliografia.

1. Mutagênese. 2. Toxicologia genética. 3. Polimorfismo (Genética). 4. Produtos químicos agrícolas. I. Título.

CDU 575:631.8(043)



**PUC
GOIÁS**

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

ATA COMPLEMENTAR Nº 79/2014

MESTRADO EM GENÉTICA DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS

DISCENTE: WANESSA FERNANDES CARVALHO

DEFENDIDA EM 10 DE FEVEREIRO DE 2014 APROVADA **COM CONCEITO**.....A

BANCA EXAMINADORA

Daniela de Melo e Silva

Profª. Dra. Daniela de Melo e Silva / PUC Goiás
(presidente-orientador)

Aparecido

Prof. Dr. Aparecido Divino da Cruz
(membro interno)

Cleber Gomes Cardoso

Prof. Dr. Cleber Gomes Cardoso / UFG
(membro externo)

Aos meus pais,
pelo exemplo de amor e dedicação aos filhos.

Para a realização do presente estudo houve a colaboração da Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC Goiás) – Programa de Pós-Graduação em Genética do Departamento de Biologia, Núcleo de Pesquisas Replicon, Departamento de Biologia da Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC-GO), Laboratório de Citogenética e Genética Molecular Humana (LaGene) – Secretaria de Saúde do Estado de Goiás.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me propiciado a vida, saúde e perseverança necessárias, para que pudesse me levantar diante de cada queda, e lutar pelos meus objetivos.

Agradeço à Coordenação de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela bolsa de Mestrado, que possibilitou a realização desse estudo e ao Professor **Dr. Cláudio Carlos da Silva**, Diretor do Departamento de Biologia da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, pelo apoio profissional.

Ao Núcleo de Pesquisas Replicon da Pontifícia Universidade Católica de Goiás por propiciar o ambiente e os materiais necessários para desenvolver esse estudo.

Em especial à minha orientadora, **Prof^ª. Dr^ª. Daniela de Melo e Silva**, pela oportunidade de fazer parte desse projeto e pela confiança de poder realizá-lo. Minha eterna gratidão pelo incentivo à pesquisa, sugestões de estudo e aprimoramento profissional.

Aos trabalhadores rurais e voluntários que gentilmente tornaram esse projeto possível.

Aos biólogos **Macks Wendhell Gonçalves, Aldaires Vieira de Melo, Damiana Mirian da Cruz e Cunha, Caroline Oliveira de Araújo Melo**, as biomédicas **Fernanda Ribeiro Godoy e Adelaide Fernandes Costa** e ao zootecnista **Alex da Silva Cruz** pela disposição na elaboração e desenvolvimento deste estudo.

Aos membros da banca avaliadora, **Professor Aparecido Divino da Cruz, PhD** e ao **Professor Dr. Clever Gomes Cardoso**, pela participação na banca examinadora e na avaliação deste estudo.

A todos os professores e amigos, a todos aqueles que contribuíram na realização e conclusão deste trabalho, minha eterna gratidão e reconhecimento.

SUMÁRIO

RESUMO	VIII
ABSTRACT	IX
LISTA DE SIGLAS E ABREVEATURAS	X
LISTA DE FIGURAS	XII
LISTA DE TABELAS	XIII
LISTA DE QUADROS	XIV
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	5
2.1. Agrotóxicos	5
2.2. Classificação dos agrotóxicos	5
2.3. Impactos à saúde humana decorrentes da exposição individual dos agrotóxicos....	8
2.4. Alterações genéticas ocasionadas pela exposição ocupacional a agrotóxicos	9
2.5. Ensaio Cometa	10
2.6. Teste do Micronúcleo.....	14
2.7. Ferramentas de investigação toxicológica e biomarcadores de susceptibilidade...	16
2.8. Polimorfismos da superfamília da Glutathione S-Transferase (GST)	17
2.8.1. GSTT1	17
2.8.2. GSTM1	19
3. OBJETIVOS	21
3.1. Objetivo Geral	21
3.2. Objetivos específicos	21
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
4.1. Grupo amostral.....	22
4.2. Ensaio Cometa	24
4.3. Teste do micronúcleo	24
4.4. Extração e quantificação das amostras e análise molecular dos genes <i>GST</i>	25
4.5. Análise estatística.....	27
5. RESULTADOS	28
6. DISCUSSÃO	34
7. CONCLUSÃO.....	38

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
9. ANEXOS	56
9.1. PCR em tempo real.....	56
9.2. Termo de consentimento livre e esclarecido	60
9.3. Questionário	62
9.4. Declaração	64
9.5. Produção científica: Evaluating genomic damages and GSTM1 and GSTT polymorphisms in rural workers occupationally exposed to pesticides: A case-control study in an agropastoral Brazilian state.....	65

RESUMO

Os agrotóxicos tem sido alvo de preocupação por parte dos diversos segmentos da sociedade, uma vez que o uso indiscriminado (regido por fatores, como: uso inadequado, alta toxicidade, falta do uso de equipamentos de proteção e precariedade dos mecanismos de vigilância) podem gerar impactos ambientais, sociais e sanitários. A exposição ocupacional de trabalhadores agrícolas ocorre por falta de informação ou recursos técnicos qualificados. Um dos problemas da utilização de agrotóxicos é a genotoxicidade de tais produtos o que pode acarretar danos genéticos. Pouco se sabe sobre a relação entre a genotoxicidade e a variação dos polimorfismos genéticos de metabolização de xenobióticos que podem modificar a suscetibilidade individual aos possíveis efeitos genotóxicos dos agrotóxicos. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito genotóxico e mutagênico da exposição ocupacional aos agrotóxicos, verificando a variabilidade polimórfica dos genes *GSTM1* e *GSTT1* em indivíduos expostos a pesticidas, associados à intoxicação, em municípios do estado de Goiás, com intensa atividade agrícola. Foram avaliados 71 trabalhadores rurais com histórico de exposição ocupacional a pesticidas e 68 controles, que apresentaram as mesmas condições socioambientais (idade, fumo, álcool). Os danos no DNA foram avaliados utilizando o teste do micronúcleo e o ensaio cometa. Para estes ensaios foram selecionados os seguintes parâmetros: comprimento da cauda do cometa, porcentagem de DNA na cauda e momento da cauda de Olive. As amostras de DNA foram obtidas a partir de linfócitos de sangue periférico utilizando o kit *Ilustra MS*® (GE, EUA), de acordo com o protocolo do fabricante. Para a reação da PCR foi utilizado *SYBR*® *Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems®, EUA). A estimativa de danos genômicos para os trabalhadores que não utilizavam EPI foi de $0,82 \pm 0,990$, para o comprimento do cometa, $0,78 \pm 0,94$ para % de DNA na cauda e $0,20 \pm 1,06$ para momento da cauda de Olive, demonstrando assim diferença estatisticamente significativa entre os parâmetros. O estudo demonstrou uma taxa relativamente alta de micronúcleos $5,42 \pm 7,32$ e células binucleadas $10,37 \pm 8,66$, em indivíduos expostos que não usavam equipamentos de proteção individual (EPI), indicando que o uso destes equipamentos pode ter efeito protetor contra os agrotóxicos ($p < 0,001$). A distribuição da frequência de *GSTM1* e *GSTT1* nulos no grupo exposto foi observada em 43,66% e 21,12% respectivamente, e o grupo controle apresentou deleção de *GSTM1* em 39,70% dos indivíduos, e para *GSTT1*, 29,41% dos indivíduos apresentaram a deleção. No entanto, não houve um aumento no risco de intoxicação para os genótipos nulos.

Palavras-chave: mutagenicidade, genotoxicidade e polimorfismos.

ABSTRACT

Pesticides have been the subject of concern by various segments of society, since the indiscriminate use (governed by factors such as: misuse, high toxicity, lack of use of protective equipment and precariousness of surveillance) and can generate environmental, social and health impacts. Occupational exposure of agricultural workers occurs due to lack of information or skilled technical resources. A problem with the use of pesticides is the genotoxicity of such products which can cause genetic damage. Little is known about the relationship between genetic variation, genotoxicity and polymorphism involved in the metabolism of xenobiotics that can modify individual susceptibility to the possible genotoxic effects of pesticides. The purpose of this study was to evaluate the genotoxic and mutagenic effects of occupational exposure to pesticides, checking the polymorphic GSTM1 and GSTT1 variability in individuals exposed to pesticides, associated with intoxication, in municipalities of the state of Goiás, with intense agricultural activity. 71 rural workers with occupational exposure to pesticides and 68 controls who had the same environmental conditions (age, smoking, alcohol) were evaluated. The DNA damage was evaluated using the micronucleus test and the comet assay. For this test the following parameters were selected, comet tail length, percentage of DNA in tail and Olive tail moment. DNA samples were obtained from peripheral blood lymphocytes using Illustra MS® kit (GE, USA), according to the manufacturer's protocol. For the PCR reaction it was used SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems®, USA). The estimation of genomic damage to workers who did not use PPE was $0.82 + 0.990$ for the length of the comet, $0.78 + 0.94$ % for DNA in the tail and $0.20 + 1.06$ for the Olive moment, thus demonstrating a statistically significant difference. The study demonstrated a relatively high micronucleus $5.42 + 7.32$ and $10.37 + 8.66$ binucleated cells in exposed individuals who did not use personal protective equipment (PPE, indicating that the use of these devices may have effect guard against pesticides ($p < 0.001$)). The frequency distribution of GSTM1 and GSTT1 null in the exposed group was observed in 43.66 % and 21.12% respectively, and the control group showed deletion of GSTM1 in 39.7 % of subjects, and GSTT1, 29.41 % of individuals showed deletion. However, there was an increased risk of intoxication for null genotypes.

Keywords: mutagenicity, genotoxicity and polymorphisms.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

DL50: Dose letalmédia (50%)

OMS: Organização Mundial da Saúde

FAO: Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura

EPI: Equipamento de Proteção Individual

SINOTOX: Sistema Nacional de Informações Tóxico Farmacológica

SINAN: Sistema de Informação de Agravos de Notificação

SIH: Sistema de Informações Hospitalares - Morbidade Hospitalar do SUS

SUS: Sistema Único de Saúde

CAT: Comunicação de Acidente do trabalho

ANVISA: Agencia Nacional de Vigilância Sanitária

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

DDT: Diclorodifeniltricloroetano

DNA: Ácido Desoxiribonucléico

GST: *Glutathione S-transferase*

GSTT1: *Glutathione S-transferase Teta 1*

GSTM1: *Glutathione S-transferase Mu 1*

Kb: Kilo Base

Ct: *CicloThreshhold*

PCR: Reação da Cadeia em Polimerase

RQ-PCR: Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real

EDTA:Ácido Etilenodiamino Tetra-acético

nM: Nano Mol

uM: Unidade Molar

ng: Nano Grama

μL: Micro Litro

MN: Micronúcleo

UV: Luz ultravioleta

TL:*Taillength*

LISTA DE FIGURAS

Figura A. Material genético de trabalhadores rurais sem exposição a agrotóxicos	11
Figura B. Material genético de trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos	12
Figura C. Desenho esquemático mostrando as posições dos genes da classe teta de <i>GST</i> no cromossomo 22, e a representação do alelo selvagem e mutante do gene <i>gstt1</i> . Adaptado de SILVA JR (2008)	18
Figura D. Desenho esquemático mostrando as posições dos genes da classe mu de <i>GST</i> , no cromossomo 1, e a representação do alelo selvagem e mutante do gene <i>GSTM1</i> . Adaptado de SILVA JR (2008)	19
Figura E. Mapa de coleta de amostras em trabalhadores rurais ocupacionalmente expostos a agrotóxicos do Estado de Goiás	22
Figura F. Box plot dos parâmetros do ensaio cometa e das células micronucleadas e binucleadas nos grupos exposto e controle	32
Figura G. Curva de amplificação da pcr em tempo real: c_t – ciclo <i>threshold</i> mostra as três fases distintas: <i>baseline</i> , exponencial e <i>plateau</i>	58
Figura H. Figura esquemática de uma reação de rq-pcr (a) reagentes e uma fita de DNA desnaturada, (b) início da reação da taq polimerase mostrando a intercalação do corante <i>sybr® green</i> na fita dupla de DNA da região alvo, iniciada pelo primer,(c) aumento da fluorescência conforme o fragmento (<i>osamplicons</i>) são formados. Adaptado de Oliveira (2010)	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação dos agrotóxicos pela Organização Mundial de Saúde quanto à toxicidade (OPAS/OMS, 2013).....	7
Tabela2. Sequência dos <i>primers</i> e suas respectivas temperaturas de desnaturação do DNA	26
Tabela3. Protocolo de termociclagem para amplificação por PCR em tempo real	26
Tabela 4. Característicasdemográficas dos trabalhadores rurais ocupacionalmente expostos a agrotóxicose grupo controle em municípios goianos	28
Tabela 5. Associação entre os dados do estilo de vida do grupo ocupacionalmente exposto aos agrotóxicos e parâmetros do ensaio cometa, células micronucleadas e binucleadas	30
Tabela 6. Média, desvio padrão e valor de <i>p</i> dos parâmetros do ensaio cometa e do teste do micronúcleo dos gruposocupacionalmenteexposto a agrotóxicos e o grupo controle....	31
Tabela 7. Distribuição dos genótipos de acordo com os parâmetros do ensaio cometa e micronúcleo nos grupos expostoocupacionalente a agrotóxicos e grupo controle.....	33

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Principais atividades agrícolas desenvolvidas nos municípios goianos que participaram do estudo envolvendo trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos.....23

1. INTRODUÇÃO

Os agrotóxicos são substâncias químicas desenvolvidas para combater ervas daninhas (herbicidas), insetos (inseticidas) e fungos (fungicidas)(BRAIBANTE 2012). No Brasil, essas substâncias eram conhecidas, pela Constituição de 1988, erroneamente, como “defensores agrícolas”, o que excluía seu uso nas atividades de vigilância sanitária, além de mascarar os efeitos negativos à saúde humana e ambiental (RODRIGUES, 2011).O termo “agrotóxico” foi introduzido no Brasil pela Lei Federal nº 7.802, de 11 de julho de 1989, regulamentada pelo Decreto 98.816, de 11 janeiro de 1990, atualmente, revogado pelo Decreto 4.074, de 4de janeiro de 2002.

Os níveis de intoxicação relatados no Brasil, mesmo com a regulamentação do uso dos agrotóxicos representam um problema à saúde pública (AUGUSTO, 2012). O registro dos dados de intoxicação por agrotóxicos é feito por vários sistemas, como o SINITOX, (Sistema Nacional de Informações Tóxico Farmacológicas) vinculado à FioCruz, o SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação), o SIH/SUS (Sistema de Informações Hospitalares - Morbidade Hospitalar do SUS) e o CAT(Comunicação de Acidentes de Trabalho). Todos vinculados diretamente ao Ministério da Saúde e ainda assim, há uma grande discrepância entre os dados epidemiológicos fornecidos por esses sistemas (BOCHNER, 2007; BOMBARDI, 2011).

No final da última década, a agricultura brasileira alcançou o primeiro lugar no ranking mundial no consumo de agrotóxicos, este cenário revelou que o Brasil está cada vez mais dependente da utilização desses produtos (FERNANDES *et al.* 2012).Os agrotóxicos, por sua vez, tem sido alvo de preocupação alarmante por parte dos diversos segmentos da sociedade, devido aoseu potencial risco ao ambiente uma vez que o uso indiscriminado (regido por fatores, como: uso inadequado, alta toxicidade, falta do uso de equipamentos de proteção e precariedade dos mecanismos de vigilância) pode gerar danos à saúde humana, animal e ambiental. No entanto, o uso de agrotóxicos não gera somente impacto ambiental, mas também impactos sociais e sanitários, os quais são agravados pela ampla utilização desses produtos, pelo desconhecimento dos riscos associados à sua utilização, pelo desrespeito às normas de

segurança, pela livre comercialização, pela pressão comercial por parte das empresas produtoras e distribuidoras e os problemas sociais presentes, principalmente, no meio rural, foco de seu maior emprego (PAUMGARTTEN, 2012).

As agências internacionais de saúde FAO (Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura) e OMS (Organização Mundial da Saúde) são responsáveis pelo registro das ocorrências de intoxicações agudas, resultantes do contato direto com produtos altamente tóxicos. As intoxicações humanas podem acarretar consequências imediatas, inclusive levando o indivíduo à morte, ou a problemas crônicos, tais como o câncer (CARNEIRO, 2012).

A contaminação ocupacional aos agrotóxicos é observada no processo de formulação (mistura e/ou diluição dos agrotóxicos para o uso) no processo de utilização (pulverização, auxílio na condução das mangueiras dos pulverizadores e descarte de resíduos e embalagens contaminadas, etc.) e na colheita (quando os trabalhadores manipulam/entram em contato com o produto). A exposição ocupacional dos trabalhadores agrícolas pode ocorrer por falta de informação ou por falta de recursos técnicos qualificados. Desta forma, equipamentos de proteção individual (EPI) tendem a não ser utilizados no momento do preparo e aplicação dos agrotóxicos, sobretudo por nem sempre estarem adequados à realidade e ao clima dos trabalhadores agrícolas brasileiros (BOMBARDI, 2011).

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 agrotóxicos sobre a saúde humana e ambiental (RIBEIRO *et al.* 2009). A notificação e a investigação das intoxicações por agrotóxicos ainda são muito precárias no Brasil, as dificuldades de acesso dos trabalhadores rurais aos centros de saúde e diagnósticos incorretos são alguns dos fatores que influenciam a falta de registro dos casos e, que na maioria dos estados brasileiros, estes agravos não são de notificação compulsória para os sistemas de vigilância epidemiológica e/ou sanitária (RODRIGUES, 2011).

Os agrotóxicos possuem em sua composição moléculas biologicamente ativas, estas podem interagir com o ácido desoxirribonucleico (DNA), danificando sua estrutura. Alterações ao nível molecular podem ser indicativas de lesões no material

genético, podendo ocorrer troca de cromátides irmãs, formação de micronúcleos, aberrações cromossômicas e aneuploidia (OMS, 2006). Estudos de monitoramento genético apontam que trabalhadores expostos aos agrotóxicos possuem dano genético associado a altos níveis de exposição e uso intensivo dos produtos que ocorrem principalmente devido à falta de mecanismos de controle da exposição ocupacional. A extensão do efeito genotóxico é influenciada principalmente pela duração da exposição a produtos químicos altamente reativos (RODRIGUES, 2011).

Alguns parâmetros genotóxicos podem ter os resultados influenciados por fatores não ocupacionais. Portanto, para aumentar a relevância destes testes, é importante avaliar fatores que podem contribuir de forma significativa para a variação encontrada entre os resultados. Fatores como predisposição genética, idade, sexo, dieta e estilo de vida podem influenciar a susceptibilidade dos indivíduos expostos. A exposição a agrotóxicos tem sido associada a um aumento na incidência de linfoma não-Hodgkin, mieloma múltiplo, sarcoma de tecidos moles, sarcoma no pulmão, pâncreas, estômago, fígado, bexiga, doença de Parkinson e problemas reprodutivos.

Nos últimos anos, o ensaio cometa tem sido usado como uma técnica sensível, confiável, rápida e de baixo custo para medir e analisar quebras das cadeias simples e duplas de DNA, sítios álcali-labeis, sítios de reparo incompleto, *crosslinks* DNA-proteínas e *crosslinks* DNA-DNA. A importância da técnica reside na exigência de uma pequena quantidade de material e da sua capacidade de avaliar o índice de dano genético nas células (KAUR; LATA, 2011).

O termo "biomarcador" é utilizado para expressar uma interação entre um 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).

As famílias de genes Glutathione S-transferase (GST) são exemplos de biomarcadores que podem ser utilizados na avaliação do risco de trabalhadores rurais ocupacionalmente expostos a agrotóxicos. As substâncias tóxicas sofrem um processo de biotransformação que é dividida em duas fases. Na fase I, as enzimas citocromo P450 promovem a ativação de drogas e pró-carcinógenos para os intermediários

eletrofilicosgenotóxicos, e podem ser formados metabólitos reativos, altamente carcinogênicos, que são biotransformados pelas enzimas inativadoras da fase II, as GSTs e NATs, em compostos mais hidrossolúveis e fáceis de eliminar (HATAGIMA, 2000).

Nesse contexto, 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 e na suscetibilidade ao desenvolvimento de tumores malignos, tais como a leucemia linfoblástica aguda em crianças, além das mielodisplasias (MDS) (LINHARES *et al.* 2006).

Vários estudos relatam os efeitos prejudiciais dos agrotóxicos à saúde humana. No entanto, no Estado de Goiás, ainda não há pesquisas que tenham utilizado várias classes de marcadores genéticos em trabalhadores agrícolas ocupacionalmente expostos a agentes químicos. Dessa forma, o presente estudo se propõe avaliar o efeito genotóxico e mutagênico da exposição ocupacional aos agrotóxicos, verificando a variabilidade polimórfica de *GSTM1* e *GSTT1* em indivíduos expostos a agrotóxicos, em municípios do estado de Goiás com intensa atividade agrícola (HEUSER *et al.* 2007).

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Agrotóxicos

Os agrotóxicos são compostos manufaturados utilizados na agricultura para prevenir ou reduzir efeitos adversos das pragas. No início do século XX iniciaram-se estudos que empregavam o uso de substâncias inorgânicas para a proteção de plantas. Produtos à base de cobre, chumbo, mercúrio e cádmio foram desenvolvidos comercialmente e empregados contra uma grande variedade de pragas. Novas tecnologias, muitas delas baseadas no uso extensivo de agentes químicos, foram disponibilizadas para o controle de doenças, aumento da produtividade e proteção contra insetos e outras pragas (HOSHI, 2009; RIBEIRO *et al.* 2009).

O Brasil é um dos líderes mundiais na produção de grãos e no consumo de agrotóxicos. Os agrotóxicos são constituídos de misturas complexas que incluem além dos ingredientes ativos, vários outros componentes como solventes de agentes umidificantes, emulsificantes e aditivos. Os agrotóxicos são os produtos mais frequentemente usados no auto-envenenamento (voluntário ou involuntário). Nos países desenvolvidos, estima-se que de três milhões de vítimas por envenenamento, 220 mil são fatais, ou seja, o alto consumo de agrotóxicos associado ao seu uso indiscriminado continua causando problemas graves para a saúde humana (PAUMGARTTEN, 2012).

2.2. Classificação dos agrotóxicos

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2012), os agrotóxicos podem ser classificados quanto: à sua ação, grupo químico a que pertencem e toxicidade.

I) Quanto à ação:

- a) Inseticidas: possuem ação de combate a insetos e larvas. Os inseticidas pertencem a quatro grupos químicos distintos: organofosforados, que são compostos orgânicos derivados do ácido fosfórico, do ácido tiosfosfórico ou do ácido ditofosfórico, carbamatos, que são derivados do ácido carbâmico, organoclorados, que são compostos à base de carbono, com radicais de cloro e piretróides, que são compostos sintéticos que apresentam estruturas

semelhantes piretrina, substância existente nas flores do *Chrysanthemum (pyrethrum) cinerariaefolium*(DA SILVA, 2011).

- b) Fungicidas: combatem fungos. Existem muitos fungicidas no mercado. Os principais grupos químicos são: etileno-bis-ditiocarbonatos, trifenilestânico, captan e hexaclorobenzeno(OLIVEIRA, 2013).
- c) Herbicidas: combatem ervas daninhas. Nas últimas duas décadas, este grupo tem tido uma utilização crescente na agricultura. Seus principais representantes são: paraquat, glifosato, pentaclorofenol, derivados do ácido fenoxiacético e dinitrofenóis (LEITE *et al.*2008).

II) Quanto ao grupamento químico:

- a) Organoclorados: Incluem compostos químicos como o clordano, DDT, pentaclorofenol, mirex, aldrin, dieldrin e hexaclorobenzeno. São substâncias químicas derivadas do petróleo, sendo pouco solúveis em água e solúveis em solventes orgânicos. Possuem uma lenta degradação, com grande potencial de contaminação de solo e água subterrânea, por ser pouco voláteis, terem boa estabilidade química, baixa taxa de biotransformação e degradação. Tais características favorecem assim a bioacumulação e a biomagnificação na cadeia alimentar (CORBI *et al.* 2006).
- b) Organofosforados: São substâncias químicas que atuam como inibidores da acetilcolinesterase, acumulando acetilcolina no tecido nervoso e órgãos efetores. São compostos constituídos de ésteres de ácido fosfórico ou ésteres de ácido tiosfosfóricos (ex. malation, paration e metil paration). (KLAASSEN, 2001).
- c) Carbamatos: São agentes como Carbaril e aldicarb, que são ésteres de N-metil (ou N, N-dimetil) de ácido carbâmico, cuja toxicidade varia de acordo com o grupo álcool ou fenol. O modo de ação dos carbamatos também se dá pela inibição da acetilcolinesterase(ANDRADE *et al.* 2009).
- d) Piretróides: Possuem uma boa atividade como inseticida e um de seus representantes mais conhecidos é a permetrina. São derivados sintéticos da piretrina, obtida a partir de extratos do crisântemo. Atuam sobre as membranas dos nervos pela modificação do canal de sódio potássio, retardando a despolarização da membrana (KLAASSEN, 2001).

- e) Fenoxiacéticos/Clorofenox: São utilizados como herbicidas, que mimetizam a ação de auxinas, um hormônio vegetal de crescimento. Alguns agentes conhecidos são: ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4 D), utilizado como agente laranja na Guerra do Vietnã, e o ácido 4cloro-*o*-toloxiacético. (HODGSON, 2004).
- f) Bipiridilos: Alguns agentes conhecidos são o paraquat, mofaquat e diquat, utilizados como herbicidas de contato não seletivo, dessecando as ervas sobre as quais foram aplicados(GOMES *et al.* 2003).

III) Quanto à toxicidade:

A classificação dos agrotóxicos quanto à toxicidade, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS, 2013) está baseada nos riscos que os agrotóxicos causam a saúde humana e ao meio ambiente. A DL50, por exemplo, é o parâmetro mais utilizado para determinar a dose letal de 50% da população de ratos tratados por via oral ou dérmica (em mg/kg de peso vivo) (Tabela 1).

Tabela 1.Classificação dos agrotóxicos pela Organização Mundial de Saúde quanto à toxicidade (OPAS/OMS, 2013).

DL 50 para ratos (mg/kg de peso vivo)					
Classe	Toxicidade	Oral		Dérmica	
		Sólidos	Líquidos	Sólidos	Líquidos
Ia	Extremamente tóxico	≤ 5	≤ 20	≤ 10	≤ 40
Ib	Altamente tóxico	5 – 50	20 – 200	10 – 100	40 – 400
II	Moderadamente tóxico	50 - 500	200 – 2000	100 – 1000	400 – 4000
III	Levemente tóxico	> 500	> 2000	> 1000	> 4000

2.3. Impactos à saúde humana decorrentes da exposição individual dos agrotóxicos

Os agrotóxicos têm a finalidade de aperfeiçoar a produção agrícola, porém representam um risco em potencial para a saúde humana e ambiental quando seu uso é indiscriminado. A exposição ocupacional a agrotóxicos pode provocar efeitos crônicos à saúde dos trabalhadores rurais, porém o seu diagnóstico e quadro clínico não têm sido caracterizado adequadamente (PERES & MOREIRA, 2007). Existem relatos graves de intoxicação por exposição direta ou indireta a esses agentes e, portanto, exposição ocupacional ou acidental constitui um grave problema de saúde pública (CORBI *et al.* 2006).

As principais vias de absorção de agrotóxicos são dérmica, digestiva e respiratória. Alguns agrotóxicos, como os organoclorados, permanecem armazenados nos tecidos de organismos vegetais e animais, incluindo o homem. Eles possuem grande estabilidade por serem lipossolúveis, o que os torna geralmente resistentes à degradação biótica ou abiótica (CARVALHO *et al.* 2011).

O sistema endócrino de seres humanos e animais pode sofrer alterações a partir da atividade dos agrotóxicos sobre o organismo. A exposição que provoca ruptura endócrina está associada, a agravos crônicos, por exemplo, câncer, infertilidade, malformações congênitas, modificações na qualidade do sêmen, etc. (DA SILVA *et al.* 2008). Os agrotóxicos podem causar desde dermatites até alguns tipos de cânceres, dependendo da sua classe química e do tipo de exposição. Diversos estudos apontam que a exposição ocupacional a agrotóxicos organoclorados está associada ao desenvolvimento dos cânceres de mama, pulmão, estômago, pâncreas e próstata (PERES *et al.* 2007).

Os tumores de pele, como o tumor de Bowen (carcinoma *in situ*), carcinoma basocelular múltiplo e carcinoma de células escamosas incidem principalmente nos agricultores expostos aos agrotóxicos arsenicais (CHAVES, 2007). A sintomatologia mais frequente da intoxicação aguda por agrotóxicos envolve cefaleia, fraqueza, dor abdominal, tonturas, tremores e paralisias (SCHOENHALS *et al.* 2009).

Os equipamentos de proteção individual (EPI) normalmente não são utilizados no momento do preparo e utilização dos agrotóxicos, sobretudo por não se adequarem

à realidade e ao clima que os trabalhadores agrícolas brasileiros enfrentam. Normalmente, a exposição ocupacional de trabalhadores agrícolas ocorre por falta de informação ou recursos técnicos qualificados (PERES *et al.* 2007).

2.4. Alterações genéticas ocasionadas pela exposição ocupacional a agrotóxicos

A genética toxicológica é uma especialidade da genética que estuda a ação de qualquer agente físico, químico ou biológico, que produz em efeitos mutagênicos e genotóxicos, sobre o material genético. As substâncias contidas nas formulações dos agrotóxicos podem provocar alterações no material genético. Assim, é necessário avaliar os possíveis efeitos mutagênicos, citotóxicos e genotóxicos dos agrotóxicos nos sistemas biológicos para poder compreender e prevenir os agravos à saúde humana decorrentes da exposição (DA FONSECA *et al.* 2013).

A molécula de DNA é constantemente agredida por fatores físicos, como luz ultravioleta (UV) e radiação gama, ou químicos, incluindo produtos do próprio metabolismo celular, como os radicais de oxigênio provenientes da respiração celular. Uma mutação é definida como uma mudança na sequência do DNA, que pode levar a uma alteração herdável da função gênica (RIBEIRO, 2003; BAGATINI *et al.* 2007).

Os sistemas de reparo do DNA constituem mecanismos de defesa extremamente eficientes que garantem a estabilidade do genoma, e conseqüentemente, a própria existência da célula e/ou do organismo. A compreensão dos mecanismos de reparo de DNA pode auxiliar a entender como agentes genotóxicos podem se tornar mutagênicos, e como podemos identificá-los. Basicamente, as vias de reparo de DNA podem ser classificadas em: I) reversão da lesão II) reparo por excisão, III) reparo recombinacional e IV) tolerância a lesões. Elas devem atuar em conjunto nas células, de modo a garantir a manutenção genética e a sobrevivência dos organismos (BERRA *et al.* 2006).

A maior parte dos agentes mutagênicos exibe um espectro de mutações característico, que depende de vários fatores como: modificações de base, mudanças nos resíduos de açúcar ou fosfato, quebras de filamentos, ou incorporações de bases modificadas, e os subseqüentes 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).

A carcinogênese inicia-se por uma alteração irreversível no DNA, com sua replicação e a proliferação celular, normalmente os processos de mutagênese e carcinogênese estão ligados (DE OLIVEIRA HIRAGI *et al.* 2011). Os carcinógenos, por sua vez, são os agentes que induzem a esse processo e geralmente é preciso repetidas exposições aos carcinógenos para que haja desenvolvimento de tumores malignos (STENERSEN, 2004).

Os biomarcadores de exposição são usados em estudos epidemiológicos como ferramenta para avaliar a exposição ocupacional, buscando estabelecer a relação entre a exposição a um agente químico e os efeitos na saúde de indivíduos expostos (ANGERER *et al.* 2007). O estudo epidemiológico realizado por OLAYA-CONTRERAS *et al.* (1998) com 153 casos de câncer de mama, demonstrou uma relação positiva e significativa entre o risco de desenvolvimento do câncer de mama e a exposição ao dicloro-difenil-tricloroetano (DDT). Utilizando o teste cometa, (DÜSMAN *et al.* 2012) verificaram que os fungicidas bifenil, sódio fenilfenol e tiabendazol induziram danos ao DNA do sistema gastrointestinal de ratos realizaram um estudo com 54 trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos e verificaram que a exposição ocupacional causa danos ao DNA.

2.5. Ensaio Cometa

Segundo SINGH *et al.* (1988), o parâmetro de análise do ensaio cometa, também conhecido por “**Single-Cell Gel Electrophoresis**” (SCGE), detecta as quebras de fita simples e de fita dupla do DNA, sendo capaz de indicar os possíveis danos em células individualizadas as quais os segmentos gerados migram do núcleo para o meio extranuclear. De acordo com o dano ocorrido na célula, podem-se estimar e identificar os efeitos genotóxicos.

OSTLING & JOHANSON (1984) relataram que o ensaio cometa foi desenvolvido com o uso de células sanguíneas misturadas em gel de agarose e submetido a uma corrida eletroforética para promover a migração do DNA em um campo elétrico constante e uniforme. A extensão do DNA está relacionada com a

intensidade do dano ocorrido, com isso CARNEIRO *et al.* (2001) afirmaram que durante a técnica de eletroforese do ensaio cometa, o núcleo que não apresentar danos no DNA migrara uniformemente, formando a imagem de um círculo, já TICE *et al.* (2000) relataram que núcleos com DNA danificado formam um “cometa”, consistindo de uma cabeça constituída pela (matriz nuclear) e uma cauda que contém o DNA fragmentado. (Figuras A e B).

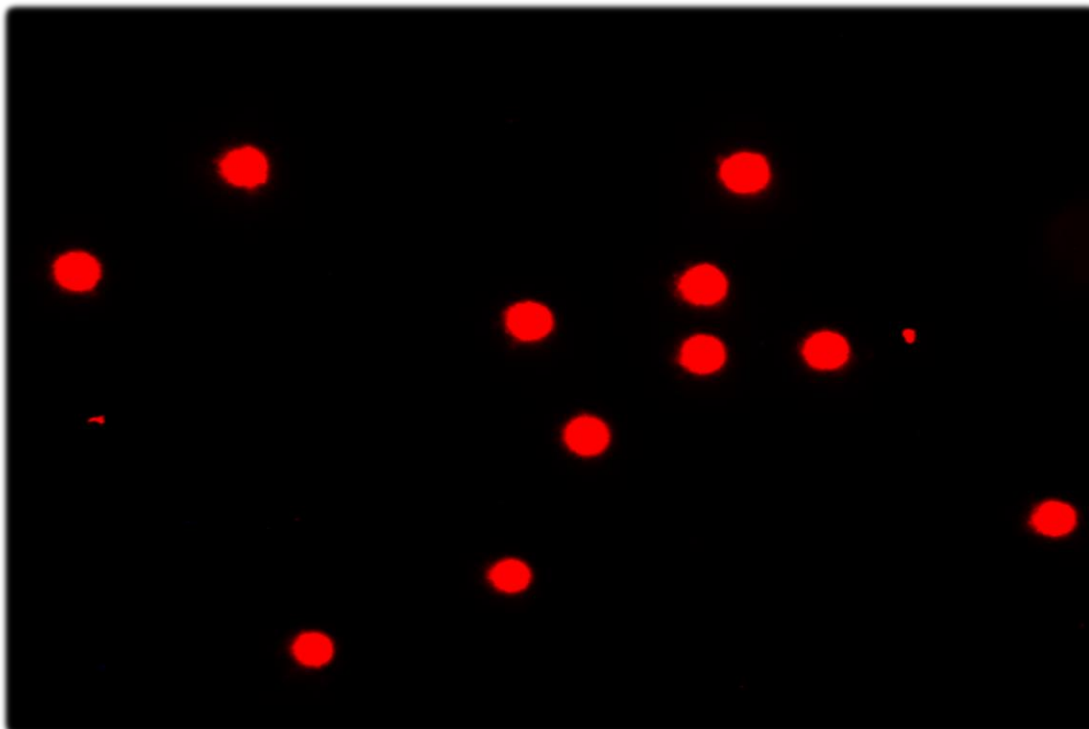


Figura A. Material genético de trabalhadores rurais sem exposição a agrotóxicos.

Fonte: Carvalho, 2013.

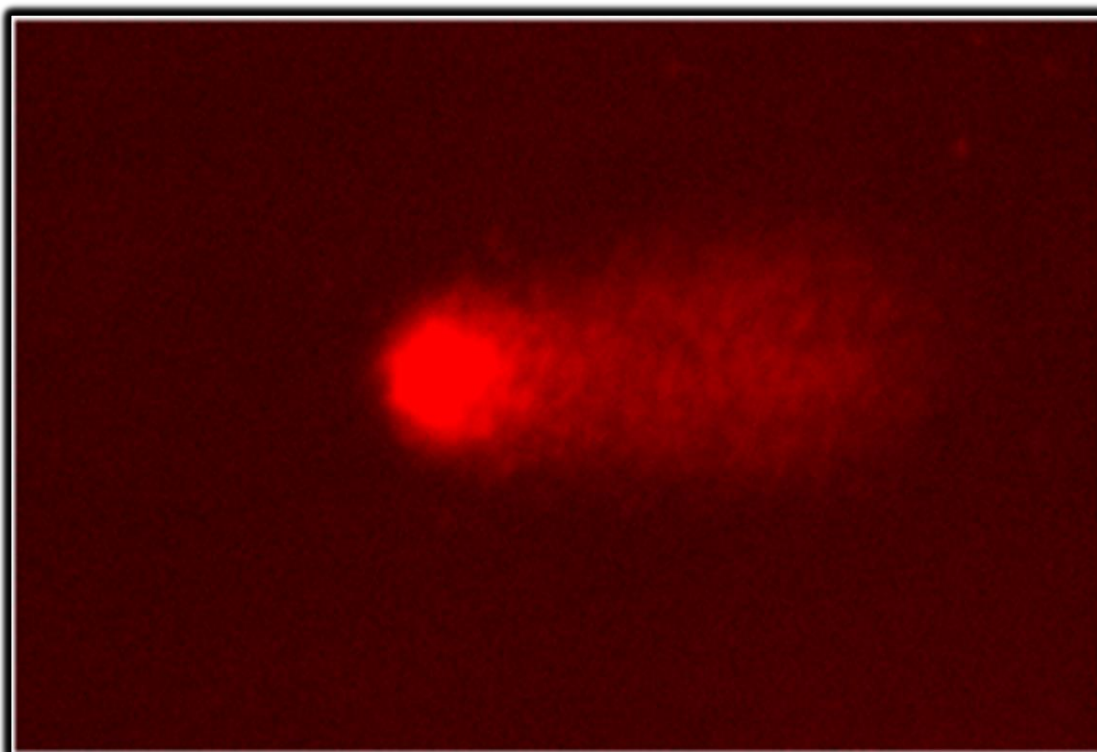


Figura B.Material genético de trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos.

Fonte: Carvalho, 2013.

Para ALBERTINI *et al.* (2000), o ensaio cometa não é utilizado para detectar mutações, mas sim lesões genômicas que são passíveis de correção, podendo dessa forma ser utilizado para estudos de reparo do DNA, trazendo informações importantes sobre a cinética e o tipo de lesão reparada, embora não possibilite inferir a fidedignidade do processo de reparo.

MITCHELMORE & CHIPMAN (1998) citaram que a vantagem de se utilizar o ensaio cometa como detector de genotoxicidade é que ele pode ser realizado em qualquer célula nucleada eucariótica, inclusive células vegetais além de ser um ensaio simples, rápido, sensível e de custo relativamente baixo. Porém, uma das críticas relacionadas a essa técnica é que a ocorrência de quebras no DNA não pode ser atribuída a uma exposição específica.

Segundo BELPAEME (1998), o ensaio cometa é realmente capaz de detectar danos no DNA causados por diferentes classes de agentes genotóxicos, dependendo das condições experimentais, das espécies, do tipo de célula e da duração da

exposição, podendo ser realizado também com células do fígado, por se tratar do principal órgão do metabolismo.

O ensaio cometa vem sendo cada vez mais utilizado como teste de genotoxicidade para o biomonitoramento de exposições ocupacionais e ambientais. Ele tem sido proposto para estudos de toxicogenética devido às suas peculiaridades e vantagens, quando comparado a outros testes para detecção de substâncias genotóxicas. O ensaio cometa detecta lesões genômicas passíveis de correção que podem resultar em mutações, quando não corrigidas. É essencialmente um teste comparativo, portanto sempre é necessária a presença de controles negativos e positivos para os experimentos (SOUZA, 2011).

Várias são as metodologias empregadas para avaliar a extensão do dano ocasionado ao DNA. Uma das medidas utilizadas na avaliação deste dano é feita pela relação entre o raio do núcleo e a extensão da cauda (*Taillength*) formada pelo DNA em migração. O TL assume valores que variam de zero - nenhum dano, a quatro - dano máximo. Outra forma de medir o dano consiste em avaliar a distribuição do DNA na cauda. A partir destas medidas outras foram sendo incorporadas na quantificação dos danos ao DNA. Alguns exemplos são: Área da célula (*Cell área*), Coeficiente de variação do cometa (*Cometcoefficient of variance*), Extensão do cometa (*Cometextent*), Intensidade óptica do Cometa (*Cometopticalintensity*), Modo de cauda (*Tailmode*), entre outras (KUMARAVEL; JHA, 2006; RIBEIRO *et al.* 2007; LIMA, 2012).

O método é amplamente utilizado em muitos estudos de detecção de quebras da fita de DNA em células individuais. Algumas das aplicações incluem:

- Estudos em humanos: É ideal para investigações em humanos, uma vez que não exigem exposições à radioatividade ou outros procedimentos prejudiciais. Tem sido usado para biomonitoramento da exposição ocupacional a produtos químicos genotóxicos à radiação.
- Monitorização ecológica: O ensaio cometa combinado com organismos adequados, pode ser usado como biosensores para medir a contaminação do ambiente com genotoxinas.

- Teste de genotoxicidade: O ensaio cometa é usado como um teste padrão para avaliar a segurança de novos produtos químicos ou farmacêuticos.
- Estimativa de reparação do DNA: A técnica pode ser utilizada para avaliar a capacidade de reparação do DNA em nível celular (PIPERAKIS, 2009).

2.6. Teste do Micronúcleo

Na citogenética clássica, a avaliação das alterações cromossômicas é realizada diretamente pela análise dos cromossomos. No entanto, a obtenção de metáfases é um processo trabalhoso. Com o intuito de verificar danos ao material genético foi desenvolvido alguns métodos que permite estimar dano cromossômico de uma maneira rápida e eficiente (DA SILVA, 2011).

SCHMID (1975) e HEDDLE (1973), independentemente, propuseram um tipo de ensaio que permitiria a avaliação do dano ao DNA pela análise e quantificação de estruturas citoplasmáticas conhecidas pelos hematologistas como corpúsculos de Howell-Jolly, os quais são encontrados em populações celulares em divisão. Os xenobióticos podem agir no núcleo, diretamente sobre o cromossomo ou sobre o fuso mitótico, levando a perda de parte dos cromossomos ou indiretamente em todo o cromossomo, respectivamente. Estes durante a citocinese, quando na formação do envoltório nuclear, se não forem incorporados pelo núcleo principal, formando micronúcleos (VILLELA *et al.* 2003).

O teste do micronúcleo é o ensaio *in vivo* mais utilizado para a detecção de agentes clastogênicos, que quebram cromossomos, e de agentes aneugênicos, que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal (TWEATS *et al.* 2007).

CAMMERER *et al.* (2007) relataram que uma das principais vantagens do teste do micronúcleo é a sua capacidade de avaliar o potencial aneugênico e clastogênico de compostos usando amostras *in vivo* e *in vitro*. Os compostos aneugênicos e clastogênicos têm diferentes mecanismos de ação. A aneuploidia é induzida pela interação com atubulina e inibição do processo de polimerização necessário para a formação do fuso mitótico, o que leva a perda de cromossomos inteiros. Já os compostos clastogênicos causam quebras cromossômicas, resultando na perda de fragmento cromossômico acêntrico. O tamanho do micronúcleo é uma variável que

pode ser usada como um parâmetro para distinguir danos causados por compostos aneugênicos (micronúcleos grandes) de compostos clastogênicos (micronúcleos pequenos).

O teste do micronúcleo é um método eficiente, de baixo investimento e um modo confiável para mensurar as transformações genéticas em grandes populações (CEPPI *et al.* 2010). A literatura científica a respeito de biomarcadores de dano ao DNA em estudos populacionais mostra um aumento no uso deste biomarcador (BONASSI *et al.* 2007). Isto se justifica pelas evidências que relacionam a frequência de micronúcleo às exposições tóxicas ambientais e ocupacionais, estilo de vida, perfil genético, câncer e ocorrência de doenças (RICKES *et al.* 2010).

Os micronúcleos aparecem nas células como pequenas estruturas contendo DNA, localizados no citoplasma. Para se manifestarem, as células precisam passar por um ciclo celular completo, incluindo uma divisão mitótica. Os MN são o resultado de quebras cromossômicas que forma fragmentos acêntricos, ou com sequências de cromossomos inteiros que não se prendem ao fuso mitótico e dessa forma, não atingem os polos das células durante a telófase (MENEGUETTI, 2011).

Os micronúcleos são identificados em qualquer tipo de célula, podendo ser avaliados para diagnóstico de doenças hematológicas, em células epiteliais da boca, do trato urinário e também monitorar ambientes quando são avaliados em organismos – testes, como anuros, roedores e plantas (SILVA *et al.* 2011).

O teste do micronúcleo em células bucais esfoliadas é um método minimamente invasivo para se estudar o DNA, a instabilidade cromossômica, a morte celular e o potencial regenerativo do tecido da mucosa bucal humana. Amostras de células da mucosa bucal tem sido utilizadas para se investigar o impacto da nutrição, estilo de vida e exposição tóxica mediante a contagem de MN em populações de casos e controles (THOMAS *et al.* 2009).

A camada basal da mucosa bucal contém as células tronco que podem expressar dano genético, como a presença de micronúcleos, representativos de perda ou quebra cromossômica durante a divisão nuclear. A avaliação da frequência de micronúcleos e outras anormalidades nucleares em células epiteliais têm sido utilizadas para identificar danos genéticos em seres humanos (FENECH, 2011), em

situações de exposição acidental ou ocupacional, para avaliar a influência do estilo de vida e para a detecção precoce de doenças relacionadas a desordens genéticas, além do envelhecimento acelerado, risco de câncer e de doenças neurodegenerativas(THOMAS *et al.* 2009).

2.7. Ferramentas de investigação toxicológica e biomarcadores de susceptibilidade

A genotoxicidade está relacionada com a capacidade de um determinado agente físico ou químico em modificar a estrutura do DNA celular, resultando em alterações, como mutações gênicas, deleções, rearranjos cromossômicos e quebras simples e duplas(LUBIN e BOICE JR, 1997; RIBEIRO, 2003).

A associação entre propriedades genotóxicas e substâncias químicas, como os agrotóxicos, torna os testes genéticos úteis no rastreamento de agentes potencialmente oncogênicos e/ou mutagênicos na caracterização do risco subsequente a uma contaminação individual (CAVAS, 2011).

Os biomarcadores de suscetibilidade são ferramentas importantes na avaliação dos danos à saúde causados pela exposição às diversas substâncias químicas. Esses marcadores, associados às alterações bioquímicas e fisiológicas, precoces ou tardias, fornecem informações que são utilizadas para estimar o risco de agravo à saúde humana(KUMAR *et al.* 2011).

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). Os genes *GSTM1* e *GSTT1* são membros da superfamília multigênica *GST*, que são comumente utilizados como biomarcadores de suscetibilidade. Tais genes têm recebido muita atenção em decorrência da alta prevalência de deleções resultando em genótipos nulos, com uma diminuição da capacidade de desintoxicar compostos cancerígenos, resultando em indivíduos com maior risco de desenvolver tumores KUMAR *et al.* 2011).

2.8. Polimorfismos da superfamília da Glutathiona S-Transferase (GST)

A superfamília de enzimas *GST* compreende uma grande variedade de proteínas citosólicas, mitocondriais, e microsossomais, possuindo um tamanho entre 45-55 kDa e sendo capazes de realizar reações com uma grande variedade de substratos, tanto endógenos e xenobióticos. Atualmente, oito classes distintas da glutathiona S-transferases foram descritas: alfa, kappa, mu, omega, pi, sigma, teta e zeta. Os genes *GSTM1* e o *GSTT1* codificam as enzimas *GSTM* (mu), e *GSTT* (teta), respectivamente (ROSSINI *et al.* 2002; LINHARES *et al.* 2006). *GSTM1* e *GSTT1* estão envolvidas na fase II do metabolismo e participam da desintoxicação de uma ampla gama de compostos, incluindo xenobióticos, carcinógenos ambientais e quimioterápicos (SINGH, SATYENDER *et al.* 2011).

A *GST* catalisa a conjugação da glutathiona-S em uma grande variedade de substratos. Esta atividade é útil na desintoxicação de compostos endógenos, tais como lipídios, assim como o metabolismo de xenobióticos (PALODETTO, 2012). As *GSTs* são principalmente encontradas no fígado, podendo ser encontradas no pulmão e intestino (DE OLIVEIRA HIRAGI *et al.* 2011; KVITKO *et al.* 2012).

Os alelos de *GSTT1* e *GSTM1* podem ser excluídos no genoma formando genótipos nulos. Em consequência, os polimorfismos de *GST* podem acarretar mudanças na atividade da enzima, contribuindo para a diferenciação da eficiência metabólica entre os indivíduos (HAYES e STRANGE, 2000). Os indivíduos que tem o genótipo nulo tem a atividade enzimática nula aumentando o risco de acúmulo de toxinas, podendo gerar um dano ao DNA, levando o aparecimento de diversas doenças, entre elas o câncer (KVITKO *et al.* 2012).

2.8.1. *GSTT1*

O gene *GSTT1* codifica uma enzima pertencente à superfamília de proteínas *GST*. A *GSTT1* está envolvida em reações de ativação e de desintoxicação de produtos químicos industriais, tais como epóxibutano, óxidos de etileno e halometano com

glutationa. A *GSTT1* é encontrada nos eritrócitos, em níveis baixos no fígado e nas células bronquiolares do pulmão (BUTLER *et al.* 2011).

O gene *GSTT* estão localizados em um sítio de recombinação no cromossomo 22q11.23 separados por aproximadamente 50 kb e são estruturalmente semelhantes, possuindo 5 éxons (Figura C) (MATEJCIC *et al.* 2011).

O gene *GSTT1* é nulo em 25,4% da população brasileira (ROSSINI *et al.* 2002). A deficiência da enzima *GSTT1* pode influenciar o risco individual para o desenvolvimento de anemia aplásica adquirida e leucemia mielóide aguda. Os fenótipos positivos para *GSTT1* são capazes de catalisar a glutatona-S-transferase. O genótipo nulo para o gene *GSTT1* aumentam o risco relativo individual para desenvolver leucoplasia (ROSSINI *et al.* 2002).

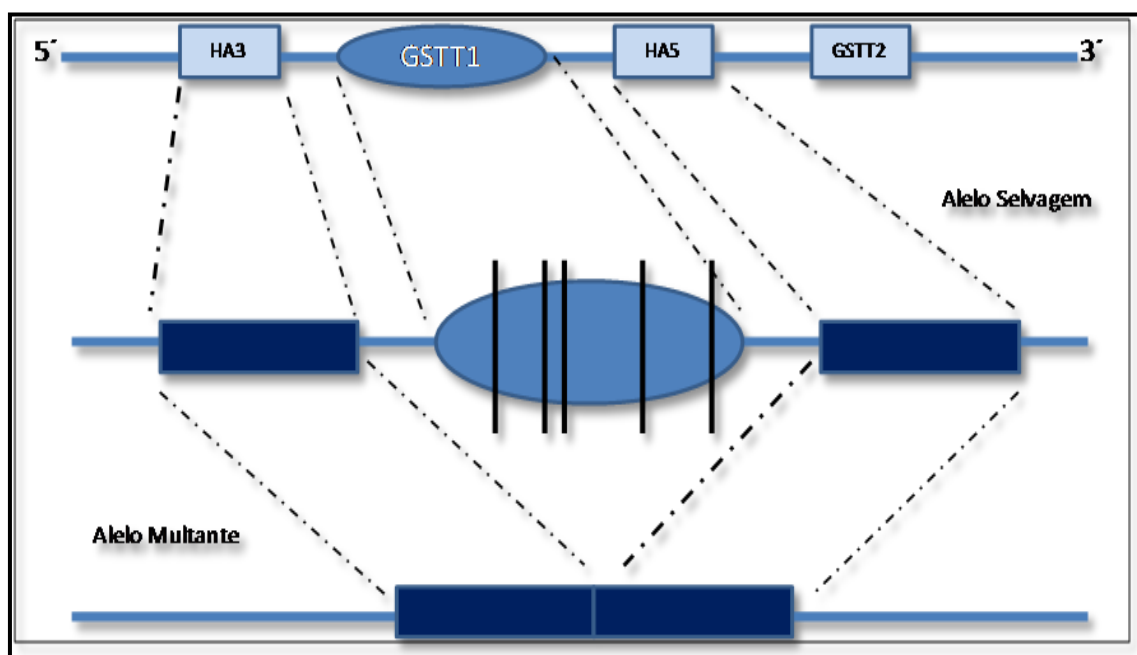


Figura C. Desenho esquemático mostrando as posições dos genes da classe teta de *gst* no cromossomo 22, e a representação do alelo selvagem e mutante do gene *gstt1*. Adaptado de SILVA JR (2008).

2.8.2. *GSTM1*

As enzimas da classe mu de *GST*, possuem pelo menos cinco genes distintos para *GSTM*: *GSTM1*, *GSTM2*, *GSTM3*, *GSTM4* e *GSTM5* que são organizados em um

agrupamento de genes no cromossomo 1p13.3 (REIS, 2011)[Figura D] e conhecidos por serem altamente polimórficos. Estas variações genéticas podem alterar a susceptibilidade de um indivíduo a carcinógenos e toxinas, bem como afetar a eficácia metabólica e a toxicidade de certas drogas (MORAIS, 2008).

As enzimas *GSTM1* têm funções na desintoxicação de compostos eletrofílicos, compostos aromáticos policíclicos, hidrocarbonetos e outros agentes mutagênicos (KUMAR *et al.* 2012).

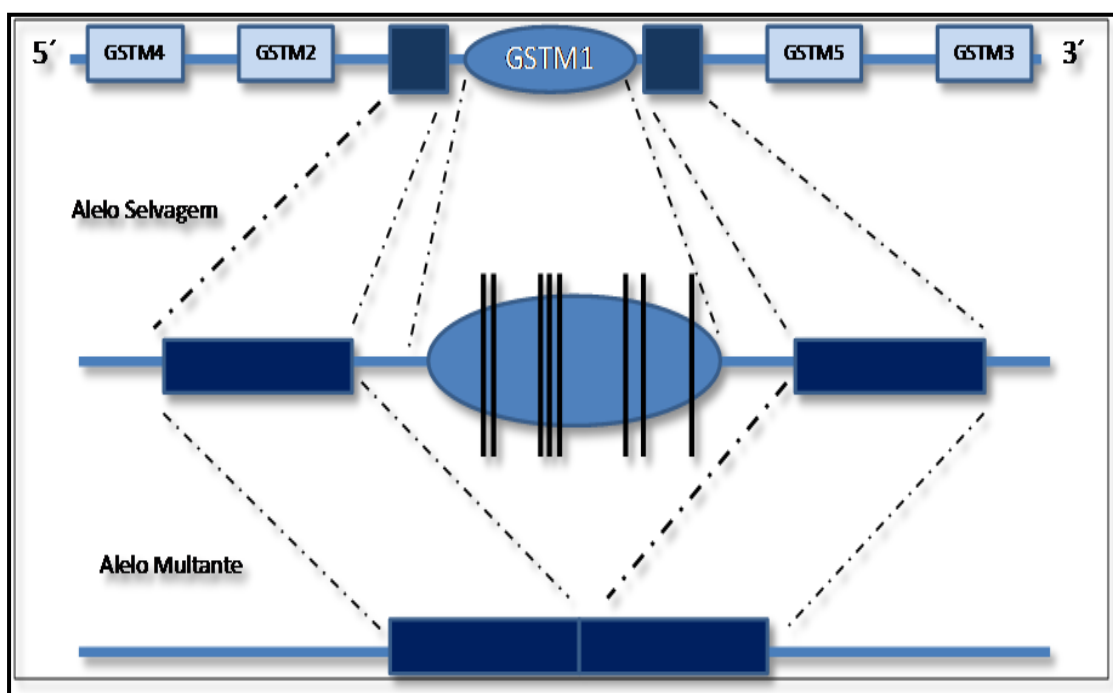


Figura D. Desenho esquemático mostrando as posições dos genes da classe mu de *GST*, no cromossomo 1, e a representação do alelo selvagem e mutante do gene *GSTM1*. Adaptado de SILVA JR (2008).

O *GSTM1* possui 8 éxons sendo o gene mais estudado dessa classe (MARCHIONI *et al.* 2011) Rossini *et al.* (2002) mostraram que na população brasileira, 42,1% possuem o genótipo nulo para *GSTM1* (HATAGIMA *et al.* 2000) confirmando os dados apresentados por outros grupos (BISELLI *et al.* 2006; GOLONI-BERTOLLO *et al.* 2006).

Mutações nulas do gene mu, têm sido associadas com um aumento de câncer, provavelmente devido à susceptibilidade às toxinas ambientais e cancerígenas. Várias

isoformas de proteínas são codificadas por variantes de transcrição deste gene (DE OLIVEIRA HIRAGI *et al.* 2011).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

- Avaliar o efeito genotóxico e mutagênico e sua relação com a variabilidade polimórfica de *GSTM1* e *GSTT1* em trabalhadores rurais ocupacionalmente expostos aos agrotóxicos.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar o potencial mutagênico e genotóxico dos agrotóxicos em trabalhadores rurais pelo teste do micronúcleo e ensaio cometa;

- Associar o estilo de vida e dados clínicos dos trabalhadores rurais ocupacionalmente expostos com os danos genômicos.

- Comparar as frequências alélicas de *GSTT1* e *GSTM1* no grupo ocupacionalmente exposto com as obtidas para o grupo controle.

- Associar as frequências das alterações e o polimorfismo dos genes *GSTT1* e *GSTM1* com o uso de EPI e os eventos de intoxicação, no grupo ocupacionalmente exposto a agrotóxico.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Grupo amostral

Este estudo seguiu um desenho experimental tipo caso-controle. Foram analisados 139 indivíduos, divididos em dois grupos, com semelhanças étnicas, porém diferentes em relação exposição a agrotóxicos. Ambos os grupos apresentaram as mesmas condições sócio-ambientais e de estilo de vida. Dados como idade, hábitos sociais, tempo de exposição e tipos de agrotóxico utilizados foram anotados em um questionário de estilo de vida aplicada para cada participante durante a entrevista de adesão ao estudo.

As 71 amostras de trabalhadores rurais ocupacionalmente expostos a agrotóxicos foram coletadas em municípios do Estado de Goiás: Abadia de Goiás, Anápolis, Bela Vista, Bonfinópolis, Itapuranga, Goiânia, Goianápolis, Leopoldo de Bulhões, Nerópolis e Turvânia. Os municípios com maior adesão dos trabalhadores foram Bela Vista de Goiás (21%), Itapuranga (27%) e Turvânia (19%) (Figura E). As 68 amostras que compuseram o grupo controle foram coletadas no laboratório Lacen da Pontifícia Universidade Católica de Goiás. O Quadro um ilustra as principais atividades agrícolas, divididas em Lavouras Permanentes e Temporárias desenvolvidas nos doze municípios goianos (IBGE 2012), ano base (2010).

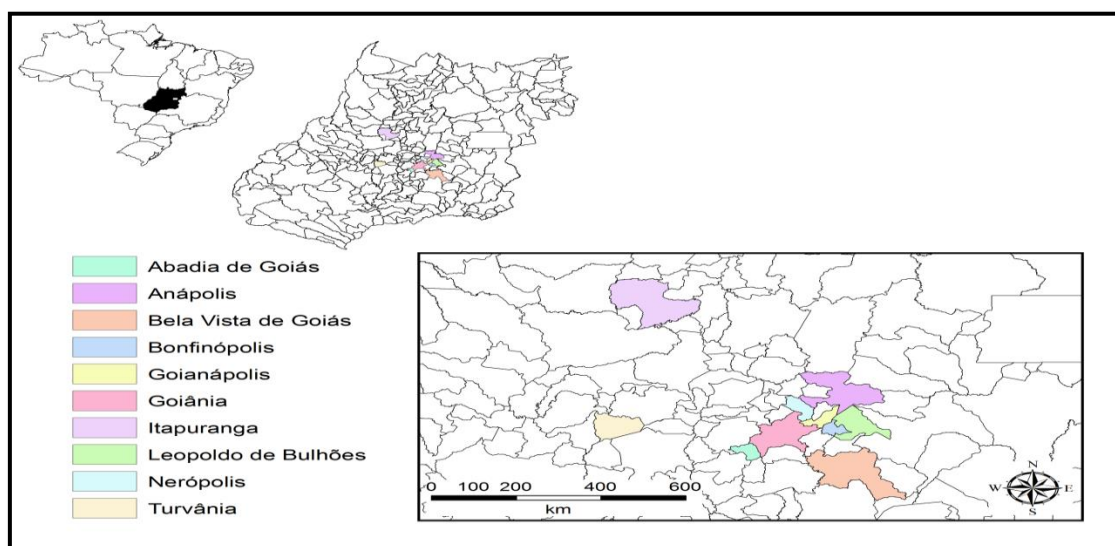


Figura E. Mapa de coleta de amostras em trabalhadores rurais ocupacionalmente expostos a agrotóxicos do Estado de Goiás.

Quadro 1. Principais atividades agrícolas desenvolvidas nos municípios goianos que participaram do estudo envolvendo trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos.

Município	Lavouras Permanentes	Lavouras Temporárias
Abadia de Goiás	Não informado	Arroz, mandioca, milho, soja e tomate.
Anápolis	Banana, café, coco-da-baía, laranja, maracujá, palmito e tangerina.	Arroz, cana-de-açúcar, mandioca, milho, soja e tomate.
Bela Vista de Goiás	Coco-da-baía, palmito, tangerina e uva.	Arroz, cana-de-açúcar, mandioca, milho, soja e tomate.
Bonfinópolis	Banana, laranja e palmito.	Arroz, mandioca, milho e tomate.
Goianápolis	Banana, laranja e tangerina.	Arroz, mandioca, milho, soja e tomate.
Goiânia	Café, coco-da-baía, laranja, limão, palmito e tangerina.	Cana-de-açúcar e mandioca.
Itapuranga	Abacate, algodão, azeitona, banana, cacau, café, caqui, figo, goiaba, laranja, maçã, mamão, manga e noz.	Abacaxi, alho, amendoim, arroz, batata, cebola, milho, soja e trigo.
Leopoldo de Bulhões	Banana, café, laranja, maracujá e palmito.	Arroz, batata, cana-de-açúcar, feijão, mandioca, milho, soja, sorgo e tomate.
Nerópolis	Abacate, azeitona, cacau, laranja, manga e palmito.	Abacaxi, algodão, alho, amendoim, batata inglesa, milho, melancia, soja e tomate.
Ouro Verde	Abacate, borracha, café, cocô-da-baía, figo, laranja, mamão e tangerina.	Algodão, arroz, aveia, fumo, mamona, mandioca, soja e sorgo.
Silvânia	Azeitona, banana, caqui, goiaba, limão, manga, pêra e pimenta-do-reino.	Abacaxi, amendoim, cana-de-açúcar, cebola, feijão, milho, tomate e trigo.
Turvânia	Banana	Arroz, cana-de-açúcar, feijão, mandioca, milho, soja e tomate.

FONTE: IBGE (2012), ano base 2010.

4.2. Ensaio Cometa

Para a realização do ensaio cometa, as lâminas foram preparadas com uma pré-cobertura de agarose “*Normal Melting*” a 1,5%. Foram coletados 5 ml de sangue de cada indivíduo. Desse total foram retirados 10 µL de sangue e embebidos em 120 µL de agarose “*Low Melting Point*” a 0,5%, a qual estava em banho maria a 37°C. Essa mistura foi colocada em lâmina de pré-cobertura de agarose e coberta com uma lamínula. Após a solidificação do material as lamínulas foram retiradas e as lâminas foram imersas em tampão de lise por 24 horas.

Após, as lâminas foram retiradas da lise e colocadas em uma cuba horizontal de eletroforese, incubadas em tampão alcalino deixando descansar por 30 minutos. A corrida eletroforética foi realizada por 25 minutos, a 25 volts e 300 Amps. A neutralização foi feita com uma solução Tampão Tris a 0,4 M (pH 7,5) por três vezes, durante 5 minutos.

A fixação foi feita com etanol absoluto por 5 minutos e o DNA foi corado com 20 µL da solução de brometo de etídio a 10 ng. Após a fixação, a lamínula foi novamente colocada sobre a lâmina deixando descansar por aproximadamente 5 minutos. Após esse tempo, as lâminas foram analisadas sob microscopia de epifluorescência, utilizando um conjunto de filtros de excitação 515-560 nm, para fluorescência vermelha. Os núcleos das células foram visualizados utilizando-se a objetiva de 10X e a imagem fluorescente foi capturada utilizando o *software* ISIS[®].

Foram analisadas duas lâminas para cada indivíduo e foram contadas, ao todo, 100 células por indivíduo, as quais foram avaliadas com o auxílio do programa “*Cometscore*” versão 1.5. Para a análise dos cometas três parâmetros relacionados a danos genômicos foram estimados: comprimento da cauda, porcentagem de DNA na cauda, momento da cauda de Olive.

4.3. Testado micronúcleo

A coleta de células da mucosa oral dos trabalhadores rurais foi realizada por meio de um abaixador de língua, retirando-se a amostra do epitélio jugal direito e

esquerdo, após um enxágue bucal realizado com água, com a função de retirar material bruto que pudesse constituir um artefato no momento da análise microscópica.

As células de todos os indivíduos foram coletadas de sítios da mucosa oral com ausência de ulcerações e outras lesões visíveis. Foram excluídos os casos que apresentam doenças bucais visíveis.

O raspado com células da mucosa oral foram espalhadas sobre as lâminas devidamente limpas com álcool a 99,5°GL. O esfregaço foi confeccionado à temperatura ambiente, sendo posteriormente fixado em álcool a 99,5°GL por 15 minutos.

A hidrólise, foi realizada num título de 1:10 (10%), usando-se 20mL de ácido clorídrico (HCl) e 200mL de água destilada (H₂O). O volume indicado foi suficiente para 10 lâminas. As lâminas foram deixadas na solução de HCl 10% por 2 minutos, à temperatura ambiente e em seguida por 6 minutos no banho-maria à 60°C. Logo, as lâminas foram levadas de volta a temperatura ambiente por 2 minutos novamente.

Após a hidrólise as lâminas foram mergulhadas em solução de fucsina básica por 15 minutos ao abrigo da luz e logo depois, enxaguadas levemente com água para retirar o excesso de corante. Em seguida, as lâminas foram levadas a solução de Fast Green por 10 segundos. Passado esse tempo, as lâminas foram enxaguadas com álcool a 70%. A análise foi feita por microscopia óptica com luz branca, com aumento de 10x e 40x. Foram avaliadas no mínimo 1000 células de cada duplicata da amostra.

4.4. Extração e quantificação das amostras e análise molecular dos genes *GST*

As amostras de DNA genômico foram obtidas a partir de linfócitos de sangue utilizando um kit para extração de sangue total (Ilustra MS ®, (GE, EUA), de acordo com o protocolo do fabricante. Em seguida, as amostras extraídas foram quantificadas utilizando o equipamento NanoVue (GE - EUA), seguindo as recomendações do fabricante. Após a quantificação, a amostra de DNA foi diluída para uma concentração final de 10 ng. Em seguida, as amostras foram armazenadas a -20 °C até o momento do uso.

Fragmentos gênicos de *GSTM1* e *GSTT1* foram detectados utilizando a reação de PCR em tempo real com a co-amplificação do gene de referência *RH92600*, usado como controle interno da reação. Os *primers* utilizados e as condições de PCR foram previamente sugeridos por MARINet *al.* (2010) e estão listados na Tabela 2. O protocolo de termociclagem pode ser visualizado na Tabela 3.

Tabela2. Sequência dos *primers* e suas respectivas temperaturas de desnaturação do DNA.

Primer	Sequência (3' - 5')	Temperatura de Desnaturação (°C)
<i>RH92600</i>	F: TCATATGCAAAACAGCTTCCC	75
	R: CTGGTCCTTCAAGCCTGTATG	
<i>GSTM1</i>	F: GAAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC	83
	R: GTTGGGCTAAATATACGGTGG	
<i>GSTT1</i>	F: TTCCTTACTGGTCCTCACTCTC	78,5
	R: TCACCGGTCATGGCCAGCA	

Tabela3. Protocolo de termociclagem para amplificação por PCR em tempo real.

Temperatura (°C)	Tempo (segundo)	Etapa
95	600'	Ativação enzimática
95	10"	
60	20"	Ciclagem 35 X
72	25"	
65	600'	Temperatura de <i>Melting</i> 0,2°C 97,2°C 162 X

Para a reação de PCR foi utilizado *SYBR*® *Green PCR Master Mix* (AppliedBiosystems®, EUA). O volume usado para PCR foi de 0,8 X 25 l contendo Master Mix, 1mM de cloreto de magnésio, 0,32 mM de primers e DNA 10ng/ μ L. Condições gerais de PCR foram desnaturação inicial a 95 °C durante 10 minutos e 35 ciclos de 95 °C durante 10 s, 60 °C durante 20 s, e 72 °C durante 25 s. O programa para a análise da curva de fusão foi de: 65 °C durante 10 s aumentando para 97,2 °C à taxa de 0,2 °C.

4.5. Análise estatística

Os hábitos de vida do grupo exposto, assim como a idade, número de filhos e demais variáveis, foram correlacionadas com as frequências de micronúcleo, frequências de células binucleadas e com os danos genômicos, avaliados pelo ensaio cometa e com os polimorfismos de GSTM1 e GSTT1. As análises incluíram estatística descritiva, teste t e Regressão Linear Simples. Todos os testes foram conduzidos com nível de significância de $p < 0,05$ e intervalo de confiança de 95%, com o uso do programa BioEstat 5.0 (AYRESet *al.* 2003).

5. RESULTADOS

A média de idade dos indivíduos que participaram como grupo controle foi de 42,0 + 16,0 e de 39,9 + 13,4 para o grupo exposto (Tabela 4). As características demográficas dos trabalhadores rurais ocupacionalmente expostos aos agrotóxicos demonstraram que, dos 71 trabalhadores, 91,5% eram homens, 53,5% apresentavam mais de 40 anos, 84,5% não fumavam, 63,4% consumiam álcool, 53,5% dos trabalhadores relataram não usar EPI durante a aplicação e/ou preparação de tais compostos e 56,3% tinham sido intoxicados durante a atividade laboral. Aproximadamente 52,1% dos trabalhadores relataram estarem expostos aos agrotóxicos a mais de 15 anos (Tabela 4).

Tabela 4. Características demográficas dos trabalhadores rurais ocupacionalmente expostos a agrotóxicos e grupo controle em municípios goianos.

Variáveis	Grupo Exposto	Grupo Controle	Valor p
	N (%)	N (%)	
Sexo (%)			
Masculino	65 (91,5)	63 (92,6)	0,811
Feminino	6 (8,5)	5 (7,4)	
Idade (%)			
< 40	33 (46,5)	33 (48,5)	0,809
≥ 40	38 (53,5)	35 (51,5)	
Anos de exposição (%)			
< 15	34 (47,8)	-	-
≥ 15	37 (52,1)	-	-
Fumo (%)			
Fumantes	11 (15,5)	7 (10,3)	0,361
Não-fumantes	60 (84,5)	61 (89,7)	
Consumo de álcool (%)			
Sim	45 (63,4)	21 (30,9)	<0,05
Não	26 (36,6)	47 (69,1)	
Uso de EPI's			
Sim	33 (46,5)	-	-
Não	38 (53,5)	-	-
Intoxicação (%)			
Sim	40 (56,3)	-	-
Não	31 (43,6)	-	-

O levantamento sobre o estilo de vida dos trabalhadores rurais de municípios goianos ocupacionalmente expostos a agrotóxicos nos permitiu observar que 56,3% desses trabalhadores foram expostos ao glifosato e 38% relataram aplicar/manipular esse produto sem o uso dos equipamentos de proteção individual. O questionário aplicado no estudo também indicou que 56,3% dos agricultores expostos ao glifosato relataram eventos de intoxicação como dores no corpo, tonturas, irritabilidade, mal-estar, tremores, vertigem, queimação no nariz e náuseas. De todos os trabalhadores que relataram sinais de intoxicação, 53,5% não usavam EPI.

Ao avaliar e comparar trabalhadores que afirmaram ter sido intoxicado pelo uso indevido de agrotóxicos, com aqueles que nunca apresentaram sintomas de intoxicação, pôde ser verificado um aumento relativo em relação ao índice de danos genômicos para os parâmetros do comprimento da cauda ($0,94 + 0,97$), porcentagem de DNA na cauda ($0,95 + 0,72$) e momento da cauda de Olive ($0,47 + 0,84$), confirmando assim diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,001$). Houve diferença significativa na frequência de micronúcleos e células binucleadas entre os trabalhadores que sofreram eventos de intoxicação, quando comparados com os que não relataram intoxicação (Tabela 5).

Para os trabalhadores que não usavam EPI, a estimativa de dano genômico para o comprimento da cauda do cometa foi $0,82 + 0,99$, para porcentagem de DNA na cauda foi de $0,78 + 0,94$, e para o momento da cauda de Olive foi $1,06 + 0,20$, apresentando diferenças estatisticamente significativas, quando tais parâmetros foram comparados com os trabalhadores que usavam EPI. Esse estudo também demonstrou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$), em relação aos dados obtidos pelo teste do micronúcleo, com uma média de $5,42 + 7,32$ micronúcleos e $10,37 + 8,66$ células binucleadas, nos trabalhadores que não usavam EPI, conforme demonstrado na Tabela 5 ($p < 0,001$).

Os dados de comprimento da cauda, porcentagem de DNA na cauda e momento da cauda de Olive demonstraram diferenças estatisticamente significativas em relação ao tempo de exposição a agrotóxicos. Ao analisar as células da mucosa oral dos trabalhadores rurais expostos aos agrotóxicos por mais de 15 anos, foi encontrado um aumento de células binucleadas $14,16 + 13,15$ e micronúcleos $5,08 + 8,1$.

Tabela 5. Associação entre os dados do estilo de vida do grupo ocupacionalmente exposto aos agrotóxicos e parâmetros do ensaio cometa, células micronucleadas e binucleadas.

	Número de indivíduos expostos (%)	Comprimento da cauda	Porcentagem de DNA na cauda	Momento da cauda de Olive	Micronúcleo	Células binucleadas
Idade						
< 40	45,07	0,58 ± 1,07*	0,45 ± 1,06*	0,02 ± 1,13*	3,66 ± 5,62*	10,28 ± 8,95*
≥ 40	54,92	0,77 ± 1,02*	0,75 ± 0,97*	0,11 ± 1,14*	5,33 ± 8,04*	13,44 ± 12,68*
Anos de exposição						
< 15	47,88	0,54 ± 1,09*	0,51 ± 1,01*	0,01 ± 1,09*	4,03 ± 5,69*	9,68 ± 8,14*
≥ 15	52,11	0,82 ± 0,98*	0,71 ± 1,02*	0,08 ± 1,19*	5,08 ± 8,15*	14,16 ± 13,15*
Fumo						
Fumantes	15,49	0,38 ± 1,19*	0,42 ± 1,21*	0,04 ± 1,11*	3,27 ± 3,28*	19,91 ± 14,45*
Não-fumantes	84,50	0,74 ± 1,01*	0,65 ± 0,98*	0,03 ± 1,28*	4,82 ± 7,56*	10,57 ± 9,92*
Consumo de álcool						
Sim	63,38	0,58 ± 1,07*	0,47 ± 1,12*	0,02 ± 1,01*	4,84 ± 7,22*	13,49 ± 12,46*
Não	36,61	0,87 ± 0,97*	0,86 ± 0,70*	0,28 ± 0,90*	4,12 ± 6,86*	9,46 ± 8,23*
Uso de EPI						
Sim	46,47	0,53 ± 1,09*	0,42 ± 1,07*	0,03 ± 1,02*	3,61 ± 6,71*	13,91 ± 13,41*
Não	53,52	0,82 ± 0,99*	0,78 ± 0,94*	0,20 ± 1,06*	5,42 ± 7,32*	10,37 ± 8,66*
Intoxicação						
Sim	56,33	0,94 ± 0,97*	0,95 ± 0,72*	0,47 ± 0,84*	4,00 ± 5,49*	9,10 ± 9,34*
Não	43,63	0,49 ± 1,06*	0,36 ± 1,14*	0,04 ± 1,20*	5,03 ± 8,10*	14,27 ± 12,08*

Analisando a média + DP (desvio padrão), foi observada uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo exposto e o grupo controle ($< 0,001$) para os parâmetros de comprimento da cauda, porcentagem de DNA na cauda e momento da cauda de Olive, frequência de micronúcleos e células binucleadas (Tabela 6 e Figura F). Isto significa que tanto o dano genômico, quanto a frequência de micronúcleos está diretamente relacionado à exposição ocupacional a agrotóxicos.

Tabela 6. Média, desvio padrão e valor de p dos parâmetros do ensaio cometa e do teste do micronúcleo dos grupos ocupacionalmente exposto a agrotóxicos e o grupo controle.

Parâmetros	Controle	Exposto	p
	Média \pm DP	Média \pm DP	
Comprimento da cauda	3,8 \pm 2,2	14,2 \pm 12,9	$< 0,001$
Porcentagem de DNA na cauda	1,2 \pm 1,8	9,3 \pm 3,4	$< 0,001$
Momento da cauda de Olive	0,1 \pm 0,2	2,9 \pm 2,6	$< 0,001$
Micronúcleo	0,9 \pm 1,0	4,6 \pm 7,1	$< 0,001$
Células binucleadas	4,3 \pm 3,5	12,0 \pm 11,3	$< 0,001$

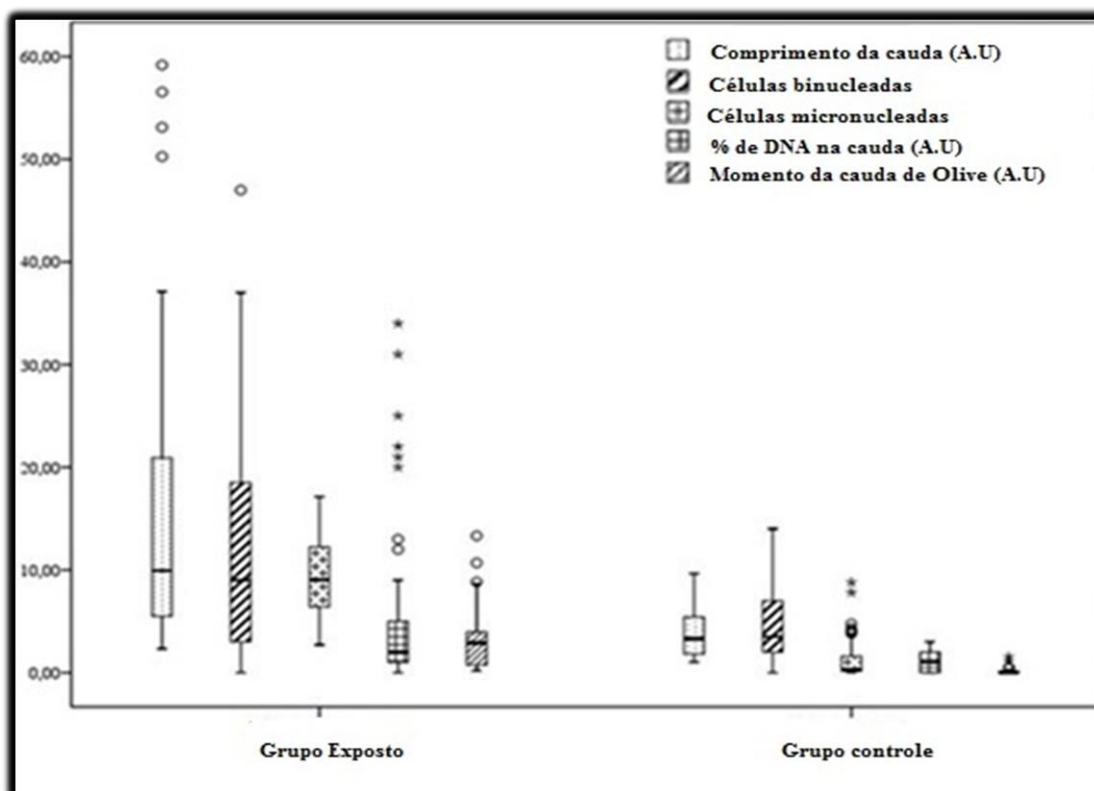


Figura F. Box plot dos parâmetros do ensaio cometa e das células micronucleadas e binucleadas nos grupos exposto e controle.

A distribuição da frequência dos genótipos GSTM1 e GSTT1 nulos no grupo exposto foram observadas em 43,7% e 12,2%, respectivamente. O grupo controle apresentou exclusão de GSTM1 em 39,7% dos indivíduos e no GSTT1, 29,4% dos trabalhadores apresentaram uma exclusão; no entanto, houve um aumento do risco de intoxicação para os genótipos nulos. Comparando a análise molecular com os danos genotóxicos e mutagênicos entre os grupos exposto e controle, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes (Tabela 7). No entanto, indivíduos com o genótipo GSTT1 nulo apresentaram os maiores valores dos parâmetros do ensaio cometa e da frequência de células binucleadas e micronúcleo quando comparado ao grupo controle.

Tabela 7. Distribuição dos genótipos de acordo com os parâmetros do ensaio cometa e micronúcleo nos grupos exposto ocupacionalmente a agrotóxico e grupo controle.

Genótipo	Número de indivíduos (%)	Comprimento da cauda	Porcentagem de DNA na cauda	Momento da cauda de Olive	Micronúcleo	Células binucleadas
Exposto						
GSTM1 Nulo	43,6	16,5± 10,4	9,7± 2,9	3,7± 2,0*	3,1± 2,8	9,9± 7,8
GSTM1 Positivo	56,3	12,5± 8,5	9,0± 2,8	2,3± 1,7*	5,7± 5,9	13,6± 10,1
GSTT1 Nulo	21,1	16,9± 16,1	9,5± 3,8	2,8± 2,9	4,8± 5,4	20,0± 12,3
GSTT1 Positivo	78,9	18,5± 15,6	9,5± 3,4	3,3± 2,6	3,07 ± 2,9	14,5 + 12,3
Controle						
GSTM1 Nulo	39,7	3,5± 1,9	0,9± 0,9	0,07± 0,09	1,1± 0,9	5,0± 2,9
GSTM1 Positivo	60,3	3,9± 1,8	1,4± 1,5	0,1± 0,2	0,8± 0,7	3,8± 2,7
GSTT1 Nulo	29,4	3,9± 1,6	1,0± 1,1	1,0± 0,1	1,0± 0,7	4,3± 2,7
GSTT1 Positivo	70,6	3,7± 1,9	1,3± 1,3	0,1± 0,1	0,9± 0,8	4,2± 2,9

6. DISCUSSÃO

O Brasil é líder mundial no consumo de agrotóxicos, e as intoxicações exógenas decorrentes da exposição ocupacional dos trabalhadores e o agravo à saúde pública, tendo em vista a possibilidade de se prevenir ou minimizar a incidência de mortes ou doenças decorrentes da interação das substâncias químicas com o organismo humano (KHAYAT *et al.* 2013). O uso de agrotóxicos tem trazido uma série de consequências para o ambiente e principalmente para a saúde dos trabalhadores rurais. As principais causas do uso inadequado dessas substâncias estão intimamente relacionados, a elevada toxicidade dos produtos, a falta de utilização de equipamentos de proteção e a insegurança a vigilância epidemiológica (PERES *et al.* 2005).

O glifosato pode causar intoxicação nos trabalhadores rurais caso seja manipulado e/ou aplicado de forma inadequada. Neste estudo 53,5% dos trabalhadores agrícolas que não usavam EPI e tinham contato direto com o glifosato relataram sinais de intoxicação. As dores de cabeça são frequentemente associadas com o uso de agrotóxicos, provavelmente porque geralmente é um dos primeiros sinais de alerta que afeta o corpo do trabalhador rural após a exposição às altas concentrações do glifosato (NUNES, 2012).

O caráter crônico da exposição a agrotóxicos foi observado em um estudo na Croácia que usou o ensaio cometa. Os autores relataram um aumento de dano genômico em trabalhadores expostos, quando comparados aos controles (GARAJVRHOVAC & ZELJEZIC 2000). Ao avaliar os trabalhadores do cultivo de soja pelo teste do micronúcleo, BORTOLI *et al.* (2009) também mostraram um aumento no número de micronúcleos, em trabalhadores expostos a agrotóxicos. No entanto, o uso de EPI não influenciou o aumento do número de células micronucleadas. Esta informação foi justificada pelos autores como uma lacuna entre o que foi relatado no estudo e a realidade das condições de trabalho.

Além disso, aumentos de micronúcleos e células binucleadas em populações que vivem em áreas contaminadas por agrotóxicos na Turquia também foram relatados (ERGENE *et al.* 2007). Esse aumento também foi observado em trabalhadores

expostos a agrotóxicos no México, quando comparados aos controles (MARTÍNEZ-VALEZUELA *et al.* 2009). Trabalhadores da indústria de agrotóxicos são também altamente expostos a danos genômicos, evidenciado pelo aumento dos micronúcleos nesta classe de profissionais (BENE *et al.* 2006).

Neste estudo, fatores como idade, tabagismo, consumo de álcool e exposição a agrotóxicos não afetaram o número de micronúcleos e células binucleadas e nos parâmetros relacionados à análise de danos genômicos do ensaio cometa, como demonstrado por outros grupos (BORTOLI *et al.* 2009; ERGENE *et al.* 2007; MARTÍNEZ-VALENZUELA *et al.* 2009; BENE *et al.* 2006).

Pesquisas brasileiras que avaliam o impacto da utilização de agrotóxicos na saúde humana tem crescido nos últimos anos (DA SILVA *et al.* 2005, FARIA *et al.* 2007, LIMA *et al.* 2011) porém ainda são insuficientes para determinar a extensão dos efeitos da exposição ocupacional e do dano à saúde dos trabalhadores que lidam com tais produtos. Um dos problemas é a falta de informação sobre o uso de agrotóxicos e dados sobre a intoxicação do trabalhador, a qual pode ocorrer pelo contato direto ou indireto com estes produtos químicos (ABHISHEK *et al.* 2010).

Neste contexto, muitos estudos (AMORIM, 2003; MOREIRA, 2004) têm mostrado a influência de susceptibilidade de biomarcadores em níveis de exposição e os efeitos nas populações ocupacionalmente expostas (HEUSER, 2007). A determinação de polimorfismos é um aspecto importante que pode aumentar a sensibilidade e especificidade dos testes, além de poder indicar os grupos sensíveis. Foram identificados vários polimorfismos de xenobióticos que metabolizam enzimas que parecem afetar os resultados de biomarcadores citogenéticos. A ativação metabólica e inativação de agentes genotóxicos ocorrem pela ação de enzimas de fase I e fase II, envolvendo várias interações (SINGH *et al.* 2011), uma vez que as GST são enzimas altamente polimórficas envolvidas na desintoxicação de vários xenobióticos (GIRI *et al.* 2011).

Neste estudo os indivíduos que apresentaram o genótipo GSTM1 sofreram a maioria dos eventos de intoxicação, devido à exposição a agrotóxicos, embora 45% das pessoas desse grupo relataram usar EPI. No entanto, não havia nenhuma associação estatisticamente significativa entre os eventos de intoxicação e a distribuição dos genótipos. SINGH *et al.* (2011) sugeriram que os genótipos nulos

GSTT1 e GSTM1, juntamente com danos no DNA, desempenham um papel importante na identificação de indivíduos com baixo risco de doença devido à exposição ocupacional a alguns agrotóxicos organofosforados.

Portanto, nosso estudo não mostrou diferenças significativas entre as distribuições de frequências genótípicas entre grupos expostos a agrotóxicos e o grupo controle. KUMAR *et al.* (2011) avaliaram aproximadamente 115 trabalhadores expostos aos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e também não encontraram diferenças significativas na distribuição genotípica. Vários estudos (HARADA *et al.* 1992; KELADA *et al.* 2000; SAADAT E SAADAT 2000; HASHIBE *et al.* 2003; ABBAS *et al.* 2004; BUGANO *et al.* 2008; ROUISSI *et al.* 2009; ZAFEREO *et al.* 2009) demonstraram a importância dos polimorfismos de genótipo GSTM1 e GSTT1 como parte do desenvolvimento de doenças como o câncer.

De acordo com os dados de KUMAR *et al.* (2012), os indivíduos expostos a hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAH) com genótipo GSTM1 nulo mostraram um risco aumentado para o desenvolvimento de tumores de laringe, pulmão, bexiga, cólon e trato gastrointestinal, e indivíduos com genótipo GSTT1 nulo tem um risco aumentado para o desenvolvimento de tumores cerebrais e tumores cólon retais. Estes resultados indicam que o polimorfismo de GSTM1 e GSTT1 desempenha um papel importante na susceptibilidade humana a agentes cancerígenos e mutagênicos, especialmente porque eles são capazes de fornecer informações adequadas sobre o risco de desenvolver câncer na população, especialmente naqueles com exposição ocupacional a agentes ambientais.

Estudos epidemiológicos têm mostrado que os polimorfismos GSTM1 e GSTT1 estão associados com aumento da suscetibilidade a doenças relacionadas ao estresse oxidativo, tais como infertilidade masculina (PARL 2009; 2006; GRIFFITHS *et al.* 2010), doenças cardiovasculares (WILSON *et al.* 2000), asma (BAHAODDINI *et al.* 2009) e esquizofrenia (HARADA *et al.* 2001; PAE *et al.* 2003; SAADAT *et al.* 2007). O estudo realizado por SUN *et al.* (2010) mostrou uma associação entre genótipos nulos e o risco para o desenvolvimento de catarata em asiáticos.

No presente estudo, a associação entre polimorfismos de GSTM1 e GSTT1 e o consumo de álcool e tabaco não foi estatisticamente significativa quando comparados os grupos controle e caso, esses fatores não causaram aumento do risco de intoxicação

por agrotóxicos. Neste contexto, as diferenças entre os resultados obtidos com o monitoramento biológico dos grupos expostos aos agrotóxicos podem refletir as condições diferentes de exposição como: a magnitude da exposição, medidas de proteção, tipo genotóxico específico, tipo de cultura, fatores ambientais, fatores endógenos, formulação e potencial para a absorção de agrotóxicos e a técnica laboratorial utilizada. Por estas razões, um estudo genotóxico desenvolvido em uma condição de risco ocupacional específico não pode ser extrapolado para outras situações em que os riscos genéticos e ocupacionais são envolvidos (BORTOLI *et al.* 2009; COSKUN *et al.* 2011).

Finalmente, a percepção de risco de trabalhadores rurais quando o uso de agrotóxicos, muitas vezes é negligenciado e pode expor os trabalhadores a risco intoxicação uma vez que muitos deles não conseguem interpretar os rótulos e bulas dos produtos (CARVALHO & PIGNATI, 2009). Outro agravante ocorre quando trabalhadores rurais são comparados a grupos maiores de trabalhadores expostos a substâncias de risco, isso ocorre porque as questões relativas aos trabalhadores rurais não têm sido uma prioridade de pesquisa na área da saúde, e eles não têm destaque as políticas regulatórias em muitos países, como ocorre no Brasil. Então, com a aplicação exagerada de produtos químicos nas lavouras brasileiras, o uso de agrotóxicos não é mais uma questão relacionada especificamente à produção agrícola, e está se tornando um problema de saúde pública, bem como um problema permanente na forma de preservação da natureza.

7. CONCLUSÃO

A análise das frequências de danos genotóxicos, mutagênicos e polimorfismos nos genes GST1 e GSTT1 encontradas nos trabalhadores ocupacionalmente expostos aos agrotóxicos permitiu chegar as seguintes conclusões:

- O ensaio cometa e o teste do micronúcleo são ferramentas valiosas para se avaliar danos genéticos em trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos, uma vez que quando comparados ao grupo controle, os indivíduos expostos tiveram aumento de micronúcleos e danos no DNA avaliados pelo ensaio cometa.
- Não houve diferenças estatisticamente significativas entre as distribuições dos genótipos de risco e de não risco nos grupos caso e controles analisados.
- O uso de equipamentos de proteção individual pode prevenir danos genéticos em trabalhadores expostos a pesticidas.
- São necessários estudos capazes de associar o polimorfismo genético de genes metabolizadores de xenobióticos, envolvendo um maior número amostral, assim como outros tipos de testes genéticos.

Novos estudos devem ser desenvolvidos objetivando esclarecer as condições e fatores de risco para trabalhadores expostos a pesticidas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.; DELVINQUIÈRE, K.; LECHEVREL M.; LEBAILLY, P.; GAUDUCHON, P.; LAUNOY, G.; SICHEL, F. 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 journal of gastroenterology: WJG**, v. 10, n. 23, p. 3389–3393. 2004.

ABHISHEK, S.; KAUR, N.; KAUR, S.; LATA, M.; SHARMAM, J.; SHARMAM, A. 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.

ALBERTINI, R. J. D.; ANDERSON, G. R.; DOUGLAS, L.; HAGMAR, K.; HEMMINK, F.; MERLO, A. T.; NATARAJAN, H.; NORPA, D. E. G.; SHUKER, R.; TICE & M. D. WATERS. Ipcs guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. International programme on chemical safety. **Mutation research**, v. 463, n. 2, p. 111–172. 2000.

AMORIM, L. C. A. Biomarkers for evaluating exposure to chemical agents present in the environment. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, jun. v. 6, n. 2, p. 158–170. . Acesso em: 24 jan. 2014. 2003.

AMORIM, L. C. A. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v. 6, n. 2, p. 158-170. 2003.

ANDRADE SOBRINHO, L. G. D.; CAPPELINI, L. T. D.; SILVA, A. A. D.; GALINARO, C. A.; BUCHVISER, S. F.; CARDOSO, D. R. & FRANCO, D. W. Teores de carbamato de etila em aguardentes de cana e mandioca. Parte II. **Química Nova**, 32(1), 116. 2009.

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.

ANNIBALLI, F.; AURICCHIO, B.; DELIBATO, E.; ANTONACCI, M. *et al.* Multiplex real-time pcrsybr green for detection and typing of group iii clostridium botulinum. **Veterinary microbiology**, v. 154, n. 3-4, p. 332–338.2012.

ANTTILA, S.; LUOSTARINEN, L.; HIRVONEN, A.; ELOVAARA, E. *et al.* Pulmonary expression of glutathione s-transferase m3 in lung cancer patients: association with gstm1 polymorphism, smoking, and asbestos exposure. **Cancerresearch**, v. 55, n. 15, p. 3305–3309. 1995.

ANVISA. Agrotóxico e toxicologia. Site ANVISA, 2012. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/anvisa/home/agrotoxicotoxicologia>. Acesso em: 10/05/13.

AUGUSTO, L. G. S. C.; PIGNATI, W.; RIGOTTO, R M.; FRIEDRICH, K.; FARIA, N M X.; BÚRIGO, A.C.; FREITAS, V.M.T.; GUIDUCCI FILHO, E. Um alerta sobre os impactos dos Agrotóxicos na Saúde Parte 2-Agrotóxicos, saúde, ambiente e sustentabilidade. **Rio de Janeiro: ABRASCO**, 2012.

AYRES, M.; AYRES JR, M.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.S. BioEstat 3.0: **Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas**. Belém, Sociedade Civil Mamirauá, 2003.

BAGATINI, M. D.; SILVA, A. C. F.; TEDESCO, Solange Bosio. Uso do sistema teste de Allium cepa como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. **Rev. Bras. Farmacogn**, v. 17, n. 3, p. 444-7. 2007.

BAHAODDINI, A.; FARRASHBANDI, H.; SAADAT, M. Genetic polymorphism of glutathione S-transferase T1 (GSTT1) and QT-interval in schizoprenia patients. **Journal of molecular neuroscience**, v. 38, n. 2, p. 173-177. 2009.

BELPAEME, K.; K. COOREMAN & M. KIRSHI – VOLDERS. Development and validation of the alkaline comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish. **Mutation Research**, 415 (3): 167-184. 1998.

BISELLI, J. M.; LEAL, R. C. A. C.; RUIZ, M. T.; GOLONI-BERTOLLO, E. M.; MANIGLIA, J. V.; ROSSIT, A. R. B. & PAVARINO-BERTELLI, E. C. Polimorfismos GSTT1 e GSTM1 em indivíduos tabagistas com carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço. **Revista Brasileira de Otorinolaringol**, 72, 654-8. 2006.

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

BOEHM, D.; HEROLD, S.; KUECHLER, A.; LIEHR, T. *et al.* Rapid detection of subtelomeric deletion/duplication by novel real-time quantitative PCR using SYBR-green dye. **Human mutation**, v. 23, n. 4, p. 368-378. 2004.

BONASSI, S. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. PMID: 16973674: **Carcinogenesis**, v. 28, n. 3, p. 625–631. 2007.

BORTOLI, G. M.; AZEVEDO, M. B.; SILVA, L. B. D. Cytogenetic biomonitoring of brazilian workers exposed to pesticides: micronucleus analysis in buccal epithelial cells of soybean growers. **Mutation research**, v. 675, n. 1-2, p. 1–4. 2009.

BRAIBANTE, M. E. F. & ZAPPE, J. A. "A Química dos Agrotóxicos." **Revista Química Nova na Escola, São Paulo**. 34.110-15. 2012.

BUCHARD, A.; SANCHEZ, J. J.; DALHOFF, K.; MORLING, N. *et al.* Multiplex per 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. 612–617. 2007.

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. 313–320.2008.

BUTLER, M. W.; HACKETT, N. R.; SALIT, J.; STRULOVICI-BAREL, Y. *et al.* Glutathione s-transferase copy number variation alters lung gene expression. **The 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.

CAMMERER, Z.; ELHAJOUJI, A.; KIRSCH-VOLDERS, M.; SUTER, W. Comparison of the peripheral blood micronucleus test using flow cytometry in rat and mouse exposed to aneugens after single-dose applications. **Mutagenesis**, v. 22, n. 2, p. 129–134. 2007.

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, N. L. & P. T. S. Ecotoxicologia: conceitos, abrangência e importância agrônômica. **Revista Monografias Ambientais**, v. 2, n. 2, p. 176-192.2011.

CARVALHO, R. M. Estudos genotóxicos, bioquímicos e hematológicos em agricultores envolvidos em manejo de pesticidas no Piauí, Brasil. In: **Congresso Brasileiro de Genética**. Guarujá, p.74. 2010.

CAVAS, T. In vivo genotoxicity evaluation of atrazine and atrazine-based herbicide on fish *carassius auratus* using the micronucleus test and the comet assay. **Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 49, n. 6, p. 1431–1435. 2011.

CEPPI, M.; BIASOTTI, B.; FENECH, M.; BONASSI, S. Human population studies with the exfoliated buccal micronucleus assay: statistical and epidemiological issues. **Mutation Research**, v. 705, p, 11-19.2010.

CHANG, H. S.; MIZUKAMI, K.; YABUKI, A.; HOSSAIN, M. A. *et al.* A novel rapid genotyping technique for Collie eye anomaly: SYBR Green–based real-time polymerase chain reaction method applicable to blood and saliva specimens on Flinders Technology Associates filter paper. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 22, n. 5, p. 708-715. 2010.

CHAVES, T.V.S. Avaliação do impacto do uso de agrotóxicos nos trabalhadores rurais dos municípios de Ribeiro Gonçalves, Baixa Grande do Ribeiro e Uruçuí–Piauí. **Dissertação de mestrado**.2007.

CORBI, J. J.; STRIXINO, S. T.; SANTOS, A.& DEL GRANDE, M. Diagnóstico ambiental de metais e organoclorados em córregos adjacentes a áreas de cultivo de cana-de-açúcar (Estado de São Paulo, Brasil). **Química Nova**, 29(1), 61-65. 2006.

COSKUN, M.; CAYIR, A.; OZDEMIR, O. Frequencies of micronuclei (mni), nucleoplasmic bridges (npbs), and nuclear buds (nbuds) in farmers exposed to pesticides in çanakkale, turkey. **Enviroentinternational**, v. 37, n. 1, p. 93–96. 2011.

COSTA, I. C. Estudo dos Efeitos Genotóxicos do Amianto em Trabalhadores Expostos. **Dissertação de mestrado**. FIOCRUZ. 2009.

DA FONSECA, C. A., & PEREIRA, D. G. Aplicação da genética toxicológica em planta com atividade medicinal. **Infarma**, 16(7/8), 51-54.2013.

DA SILVA, F. C. Avaliação de mutagênese provocada por sulfato de ferro através do teste micronúcleo em células da medula óssea de camundongos. **Revista Científica FAEMA**, 2(1), 13-21.2011.

DA SILVA, J. M. Agrotóxico e trabalho: uma combinação perigosa para a saúde do trabalhador rural. **CiênciasSaúdeColetiva**, 10(4), 891-903.2005.

DARZYNKIEWICZ, Z.; SMOLEWSKI, P.; HOLDEN, E.; LUTHER, E.;

HENRIKSEN, M.; FRENÇOIS, M.; LEIFERT, W.; FENECH, M. Laser scanning cytometry for automation of the micronucleus assay. **Mutagenesis**, jan. v. 26, n. 1, p. 153–161. 2011.

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.

DÜSMAN, E. Principais agentes mutagênicos e carcinogênicos de exposição humana. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, 7(2).2012.

ERGENE, S.; CELIK, A.; CAVAS, T.; KAYA, F. Genotoxic biomonitoring study of population residing in pesticide contaminated regions in göksu delta: micronucleus, chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges. **Environment international**, out. v. 33, n. 7, p. 877–885. 2007.

FADERL, S.; HOCHHAUS, A.; HUGHES, T. Monitoring of minimal residual disease in chronic myeloid leukemia. **Hematology/oncology clinics of North America**, jun. v. 18, n. 3, p. 657–670. 2004.

FARIA, N. M. X.; FASSA, A. G.; FACCHINI, L. A. Pesticides poisoning in Brazil: the official notification system and challenges to conducting epidemiological studies. **Ciência & saúde coletiva**, mar. v. 12, n. 1, p. 25–38. 2007.

FENECH, M. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. **Mutagenesis**, jan. v. 26, n. 1, p. 125–132. 2011.

FERNANDES, V.; SILVA, L.; MESQUITA, T.; CAPETTINI, L. *et al.* Uso de pesticidas na agricultura-Análise da prática na cidade de Ibirité/MG. **Scientia Plena**, v. 8, n. 3. 2012.

GARAJ-VRHOVAC, V.; ZELJEZIC, D. Assessment of genoma damage in a population of Croatian workers employed in pesticide production by chromosomal

aberration analysis, micronucleus assay and Comet assay. **Journal of Applied Toxicology**, Chichester, v. 22, n. 4, p. 249-255. 2002.

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

GINZINGER, D. G. Gene quantification using real-time quantitative pcr: an emerging technology hits the mainstream. **Experimental hematology**, jun. 2002. v. 30, n. 6, p. 503–512. 2002.

GIRI, S. K.; ANITA, Y.; KUMAR, A.; DEV, K. *et al.* Association of gstm1 and gstt1 polymorphisms with dna damage in coal-tar workers. **The Science of the total environment**, 15 set. v. 409, n. 20, p. 4465–4469. 2011.

GOLONI-BERTOLLO, E. M.; BISELLI, J. M.; MANÍGLIA, J. V.; ROSSIT, A. R. B.; RUIZ, M. T. & PAVARINO-BERTELLI, E. C. Evaluation of the influence of gstt1 and gstm1 null genotypes in head and neck carcinogenesis. **Revista da Associação Médica Brasileira (1992)**, out. v. 52, n. 5, p. 365–368. 2006.

GOMES, J. C.; SOARES, L. F.; PEREIRA, C. & JHAM, G. N. Efeito do dessecante paraquat na qualidade da fração lipídica da soja. **Ciência e Agrotecnologia**, 27(1), 178-184. 2003.

GRIFFITHS, B.; BALL, B.; DANIELL, T.; HALLETT, P.; NEILSON, R.; WHEATLEY, R.; BOHANEK, M. Integrating soil quality changes to arable agricultural systems following organic matter addition, or adoption of a ley-arable rotation. **Appl Soil Ecol**, 46:43-53. 2010

GROVER, J. K.; YADAV, S.; VATS, V. Medicinal plants of india with anti-diabetic potential. **Journal of ethnopharmacology**, jun. v. 81, n. 1, p. 81–100. 2002.

GRUBER, F.; FALKNER, F. G.; DORNER, F.; HÄMMERLE, T. Quantitation of viral dna by real-time pcr applying duplex amplification, internal standardization, and two-color fluorescence detection. **Applied and environmental microbiology**, jun. v.

67, n. 6, p. 2837–2839.2001.

HARADA, S.; MISAWA, S.; NAKAMURA, T.; TANAKA, N.; UENO, E.; NOZOE, M. Detection of *gst1* gene deletion by the polymerase chain reaction and its possible correlation with stomach cancer in japanese. **Human genetics**, out. v. 90, n. 1-2, p. 62–64. 1992.

HARADA, S.; TACHIKAWA, H.; KAWANISHI, Y. Glutathione s-transferase m1 gene deletion may be associated with susceptibility to certain forms of schizophrenia. **Biochemical and biophysical research communications**, 23 fev. v. 281, n. 2, p. 267–271. 2001.

HASHIBE, M.; BRENNAN, P.; STRANGE, R. C.; BHISEY, R. *et al.* Meta- and pooled analyses of *gstm1*, *gstt1*, *gstp1*, and *cyp1a1* genotypes and risk of head and neck cancer. **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology**, dez. v. 12, n. 12, p. 1509–1517. 2003.

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, 2000.

HAYES, J. D.; STRANGE, R. C. Glutathione s-transferase polymorphisms and their biological consequences. **Pharmacology**, set. v. 61, n. 3, p. 154–166. 2000.

HEDDLE, J. A. A rapid in vivo test for chromosomal damage. **Mutation research**, maio. v. 18, n. 2, p. 187–190. 1973.

HEUSER, V.D.; ERDTMANN, B.; KVITKO, K.; ROHR, P.; DA SILVA, J. Evaluation of genetic damage in brazilian footwear-workers: biomarkers of exposure, effect, and susceptibility. **Toxicology**, 11 abr. 2007. v. 232, n. 3, p. 235–247.

HIRVONEN, A.; HUSGAFVEL-PURSIAINEN, K.; ANTTILA, S.; VAINIO, H. The *gstm1* null genotype as a potential risk modifier for squamous cell carcinoma of the lung. **Carcinogenesis**, jul. v. 14, n. 7, p. 1479–1481. 1993.

HODGSON, E.A textbook of modern toxicology. United States of America: **Wiley-Interscience**, 2004.

HOSHI, L. Genotoxicidade em floricultores da região serrana do Rio de Janeiro: uso do teste de micronúcleo na mucosa oral; Genotoxicity in flowergrowers in themountainousregionof Rio de Janeiro: use ofmicronucleustest in oral mucosa. **Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca**. 2009.

IBGE. Levantamento sistemático da produção agrícola. Estatística. **F. I. B. D. G. E.** 25:1-88 p. 2012.

KAUR, R.; KAUR, S.; LATA, M. Evaluation of DNA damage in agricultural workers exposed to pesticides using single cell gel electrophoresis comet assay. **Indian journal of human genetics**, set. v. 17, n. 3, p. 179–187. 2011.

KELADA, S.N.; KARDIA, S.L.; WALKER, A.H.; WEIN, A.J.; MALKOWICZ, S.B.; REBBECK,T.R.The glutathione s-transferase-mu and -theta genotypes in the etiology of prostate cancer: genotype-environment interactions with smoking. **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology**, dez. v. 9, n. 12, p. 1329–1334. 2000.

KERN, R. Avaliação de micronúcleo em células epiteliais bucais em estudantes de odontologia. **Tese de Doutorado**. Dissertation Master of Dentistry–State University of Ponta Grossa, Article.2006.

KHAYAT, C.B.;COSTA, E.O.; GONÇALVES, M.W.;DA CRUZ E CUNHA DM, DA CRUZ AS, DE ARAÚJO MELO C.O.; BASTOS, R.P.; DA CRUZ A.D.; DE MELO E SILVA,D.Assessmentofdnadamage in brazilianworkersoccupationallyexposedtopesticides: a studyfrom central brazil. **Environmental science and pollution research international**, out. v. 20, n. 10, p. 7334–7340. 2013.

KLAASSEN, C.D. Casarett and Doull’s Toxicology: The Basic Science of Poisons, **6 ed. New York: McGraw-Hill**, 2001.

KUBISTA, M.; ANDRADE, J. M.; BENGTTSSON, M.; FOROOTAN, A. *et al.* The real-time polymerase chain reaction. **Molecular aspects of medicine**, jun. v. 27, n. 2-3, p. 95–125. 2006.

KUMAR, A.; YADAV, A.; GIRI, S.K.; DEV, K.; GULATI, S.; GAUTAM, S.K.; GUPTA, R.; AGGARWAL, N. Allelic variation of GSTM1 and GSTT1 genes in Haryana population. **Gen Med Biomar Health Sci**. 2012.

KUMAR, A.; YADAV, A.; GIRI, S.K.; DEV, K.; GAUTAM, S.K.; GUPTA, R.; AGGARWAL, N. Effect of genetic polymorphism of gstm1 and gstt1 genotypes on cytogenetic biomarkers among coal tar workers. **Environmental toxicology and pharmacology**, set. v. 32, n. 2, p. 128–135. 2011.

KUMARAVEL, T. S.; JHA, A. N. Reliable comet assay measurements for detecting dna damage induced by ionising radiation and chemicals. **Mutation research**, 16 jun. v. 605, n. 1-2, p. 7–16. 2006.

KVITKO, K.; BANDINELLI, E.; HENRIQUES, J. A. P.; HEUSER, V. D. Susceptibility to DNA damage in workers occupationally exposed to pesticides, to tannery chemicals and to coal dust during mining. **Genetics and molecular biology**, dez. v. 35, n. 4, p. 1060–1068. 2012.

LALLEMAND, F.; DESIRE, N.; ROZENBAUM, W.; NICOLAS, J. C. Quantitative analysis of human herpesvirus 8 viral load using a real-time pcr assay. **Journal of clinical microbiology**, abr. v. 38, n. 4, p. 1404–1408. 2000.

LATORRACA, A.; MARQUES, G. J. G.; SOUSA, K. V.; FORNÉS, N. S. Agrotóxicos utilizados na produção do tomate em Goiânia e Goianópolis e efeitos na saúde humana; Pesticides used in tomato production in Goiânia and Goianópolis and their effect on human health. **Comun. ciênc. saúde**, v. 19, n. 4, p. 365-374. 2008.

LEITE, K. C.; TORRES, M. B. R. O Uso de agrotóxicos pelos trabalhadores rurais do assentamento Catingueira Baraúna-RN. **Revista verde de agroecologia e desenvolvimento sustentável**, v. 3, n. 4. 2008.

LIMA, J. S.; MOREIRA, J. C.; JACOB, S. C.; ARAÚJO, A. J.; SOARES, M. O.; KUBOTA, A. H. & MARKOWITZ, S. Riscos coletivos e impacto do uso de agrotóxicos sobre a saúde humana e ambiental: um estudo piloto de saúde ocupacional. **Desenvolvimento e Meio Ambiente**, 2011.

LIMA, P. D. L. Biomarcadores de estresse oxidativo e dano ao DNA em tilápia do nilo exposta às águas da planta de tratamento de agroindústria de suínos. 2012.

LINHARES, J. J.; DA SILVA, I. D. C. G.; NORONHA, E. C.; FERRARO, O. Polimorfismo em gene do receptor da progesterona (PROGINS) e da glutathione S-transferase (GST) e risco de câncer da mama: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 52, n. 4, p. 387-393. 2006.

LUBIN, J. H.; BOICE, J. D. Jr. Lung cancer risk from residential radon: meta-analysis of eight epidemiologic studies. **Journal of the National Cancer Institute**, 1 jan. v. 89, n. 1, p. 49-57. 1997.

MACKAY, I. M. Real-time PCR in microbiology: from diagnosis to characterization. **Caister Academic Press**, 2007.

MARCHIONI, D. M. L. Interação entre consumo alimentar e polimorfismos da GSTM1 e GSTT1 no risco para o câncer de cabeça e pescoço: estudo caso-controle em São Paulo, Brasil Interaction between dietary intake and GSTM1 and GSTT1 and cancer risk. **Cad. Saúde Pública**, 27(2), 379-387. 2011.

MARTÍNEZ-VALENZUELA, C. *et al.* Genotoxic biomonitoring of agricultural workers exposed to pesticides in the north of Sinaloa state, Mexico. **Environment International**, nov. v. 35, n. 8, p. 1155-1159. 2009.

MATEJCIC, M.; LI, D. P.; PRESCOTT, N. J.; LEWIS, C. M. *et al.* Association of a deletion of gstm2b with an altered risk of oesophageal squamous cell carcinoma in a South African population: a case-control study. **PloS One**, v. 6, n. 12, p. 2011.

MENEGUETTI, D.U.O. Adaptation of the technical micronucleus in *Allium cepa*, to future analysis of mutagenicity of the rivers of the Vale do Jamari -Rondônia, Brazil.

X Congresso Brasileiro da Sociedade Brasileira de Mutagênese Carcinogênese e Teratogênese Ambiental (SBMCTA), São Pedro-SP, 2011.

MITCHELMORE, C. L.; CHIPMAN, J. K. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. **Mutation research**, v. 399, n. 2, p. 135–147.1998.

MORAIS, L. M. T. S.; LOURENÇO, G. J.; SHINZATO, J. Y.; ZEFERINO, L. C.; LIMA, C. S. P.& GURGEL, M. S. C. Polymorphisms gstm1 and gstm1 and sporadic breast cancer mammographic features. **Revista da Associação Médica Brasileira** (1992), fev. v. 54, n. 1, p. 61–66. 2008.

MOREIRA, F. R.; MOREIRA, J. C. Effects of lead exposure on the human body and health implications. **Revista panamericana de salud pública = Pan American journal of public health**, v. 15, n. 2, p. 119–129. 2004.

NUNES, G.C. Uso do EPI–equipamentos de proteção individual nas pequenas propriedades rurais produtoras de fumo no município de Jacinto Machado–SC. 2012.

OLAYA-CONTRERAS, P.; RODRIGUEZ-VILLAMIL, J.; POSSO-VALENCIA, H.; CORTEZ, J. Organochlorine exposure and breast cancer risk in colombian women. **Cadernos de saúde pública**, v. 14 Suppl3, p. 125–132. 1998.

OLIVEIRA, R.L. O uso dos agrotóxicos e seus efeitos nocivos para o meio ambiente e para a saúde dos agricultores do Sítio Curral Grande, Coatigereba, **Folha, Ipioca e Piripirino** Município de Itapororoca-PB. 2013.

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

OPAS/OMS. Manual de vigilância de saúde de populações expostas a agrotóxicos. Brasília, 1996. Disponível em: < <http://www.opas.org.br/publico> Acesso em: 28 maio. 2013.

OSTLING, O. & K. J. JOHANSON. Study of radiation- induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun**, 123: 291–298. 1984.

OSTLING, O.; JOHANSON, K. J. Microelectrophoretic study of radiation-induced dna damages in individual mammalian cells. **Biochemical and biophysical research communications**, 30 ago. v. 123, n. 1, p. 291–298. 1984.

PAE, C. U.; KIM, J. J.; LEE, S. J.; LEE, C. U. *et al.* Association study between glutathione transferase P1 polymorphism and schizophrenia in the Korean population. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 27, n. 3, p. 519-523. 2003.

PALODETTO, B. Influência dos polimorfismos CYP2B6 G15631T, GSTM1, GSTT1, NQO1 C609T e MDR-1 C3435T na resposta ao tratamento de leucemia aguda e síndrome mielodisplásica. 2012.

PARL, F. A need for true gstm1 and gstt1 genotyping. **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology**, v. 18, n. 10, p. 2793. 2009.

PAUMGARTTEN, F. J. R. Pesticide exposure and poor pregnancy outcomes: weaknesses of the evidence. **Cadernos de saúde pública**, v. 28, n. 10, p. 2009–2012.

PERES, F. Challenges in the study of human and environmental contamination by pesticides. **Ciência&Saúde Coletiva**, 10, 27-37. 2005.

PERES, F.; MOREIRA, J. C. Health, environment, and pesticide use in a farming area in rio de janeiro state, brazil. **Cadernos de saúde pública**, v. 23 Suppl4, p. S612–621. 2007.

PERES, F.; MOREIRA, J. C.; DUBOIS, G. S.; MOREIRA, J. Agrotóxicos, saúde e ambiente: uma introdução ao tema. *É veneno ou é remédio*, p. 23-4. 2003.

PIPERAKIS, S. M. Cometassay: a brief history. **Cell biology and toxicology**, v. 25, n. 1, p. 1–3. 2009.

PONCHEL, F.; TOOMES, C.; BRANSFIELD, K.; LEONG, F. T. *et al.* Real-time pcr based on sybr-green i fluorescence: an alternative to the taqman assay for a relative

quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. **BMC biotechnology**, v. 3, p. 18.2003.

POUCKE, M. VAN; ZEVEREN, A. VAN; PEELMAN, L. J. Combined fam-labeled taqman probe detection and sybr green i melting curve analysis in multiprobeqpcr genotyping assays. **BioTechniques**, v. 52, n. 2, p. 81–86. 2012.

RAMSDORF, W. Utilização de duas espécies de *Astyanax*(*Astyanax*sp. *B* e *A. altiparanae*) como bioindicadores da região contaminada por agrotóxicos (Fazenda Canguiri – UFPR). Dissertação (Mestrado em genética) – **Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba**, 2007.

REIS, A. A. S.; DA SILVA, D. P.; MUNDIM, C. A.; JESUÍNO, R. S. A. *et al.* As implicações do polimorfismo genético do gene *gst* na patogênese do diabetes mellitus tipo 2. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 9, n. 2, p. 92-100.2011.

RIBEIRO, L. R. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo*. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (Org.). **Mutagênese Ambiental, Canoas: Ulbra**, p. 355-356. 2003.

RIBEIRO, L. R., Ed. Toxicologia Genética Mutagenese Ambiental. **SBMCTA**, v.1ª ed. 2003.

RIBEIRO, M. L.; PRIOLLI, D. G.; MIRANDA, D. D. D. C.; PAIVA, D. A.; PEDRAZZOLI JÚNIOR, J.& MARTINEZ, C. A. R. Evaluation of DNA oxidative damage in normal and neoplastic cells of colonic mucosa in patients with colorectal cancer. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, 27(4), 391-402.2007.

RIBEIRO, M. L.; LOURENCETTI, C.; POLESE, L.; NAVICKIENE, S.*et al.* Pesticidas: Usos e Riscos para o Meio Ambiente. **HolosEnvironment**, v. 8, n. 1, p. 53-71.2009.

RICKES, L. N.; ALVARENGO, M. C.; SOUZA, T. M.; GARCIA, G. L.; MARTINOROTH, M. G. Increased micronucleus frequency in exfoliated cells of the buccal mucosa in hairdressers. **Genetics and molecular research: GMR**, v. 9, n. 3, p. 1921–

1928. 2010.

RODRIGUES, V. R. C. B. Avaliação das alterações hematológicas, bioquímicas e genotóxicas nos trabalhadores expostos à agrotóxicos em municípios do estado do Piauí. 2011.

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. **Genetics and molecular research: GMR**, v. 1, n. 3, p. 233–240. 2002.

ROUISSI, K.; OUERHANI, S.; MARRAKCHI, R.; SLAMA, M. B.; SFAXI, M.; AYED, M.; CHEBIL, M.; EL-GAAIED, A. B. 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 Genet Cytogenet**, 190:101-107. 2009.

SAADAT, I.; SAADAT, M. The glutathione s-transferase mu polymorphism and susceptibility to acute lymphocytic leukemia. **Cancer letters**, v. 158, n. 1, p. 43–45. 2000.

SAADAT, M.; MOBAYEN, F.; FARRASHBANDI, H. Genetic polymorphism of glutathione s-transferase t1: a candidate genetic modifier of individual susceptibility to schizophrenia. **Psychiatry research**, v. 153, n. 1, p. 87–91. 2007.

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**, v. 31, n. 7, p. 1193–1203. 2013.

SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutation research**, v. 31, n. 1, p. 9–15. 1975.

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.

SCHOENHALS, M., FOLLADOR, F. A. C., & SILVA, C. Análise dos impactos da fumicultura sobre o meio ambiente, à saúde dos fumicultores e iniciativas de gestão

ambiental na indústria do tabaco. **Engenharia Ambiental, Espírito Santo do Pinhal**, 6(2), 016-037.2009.

SILVA JÚNIOR, R. L. Implicações dos polimorfismos genéticos de CYP1A1, GSTM1 E GSTT1 na suscetibilidade do carcinoma espinocelular da laringe. Dissertação de Mestrado. **Universidade Federal de Goiás. Goiânia, GO**. 163 p.2008.

SILVA, F. C. Avaliação de mutagênese provocada por sulfato de ferro através do teste micronúcleo em células da medula óssea de camundongos. **Revista científica da Faculdade de Educação e Meio Ambiente**, v. 2, n.1, p. 13-22. 2011.

SILVA, J. Evaluation of genetic damage in a brazilian population occupationally exposed to pesticides and its correlation with polymorphisms in metabolizing genes. **Mutagenesis**, v. 23, n. 5, p. 415–422. 2008.

SINGH, N. P. A simple technique for quantitations of low levels of DNA damage in individual cells. 175: 184-191.1988.

SINGH, S.; KUMAR, V.; SINGH, P.; THAKUR, S.; BANERJEE, B. D.; RAUTELA R.S.; GROVER, S. S.; RAWAT, D. S.; PASHA, S.T.; JAIN, S.K. Genetic polymorphisms of gstm1, gstt1 and gstp1 and susceptibility to dna damage in workers occupationally exposed to organophosphate pesticides. **Mutationresearch**, v. 725, n. 1-2, p. 36–42. 2011

SOUZA, D.R. Aplicabilidade de reações de Fenton e foto-Fenton no tratamento de glifosato comercial. **Tese de Doutorado**. 2011.

SUN, L.; XI, B.; YU, L.; GAO, X. C. *et al.* Association of glutathione s-transferases polymorphisms (gstm1 and gstt1) with senile cataract: a meta-analysis. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 51, n. 12, p. 6381–6386.2010.

THOMAS, P. Buccal micronucleus cytome assay. **Natureprotocols**, v. 4, n. 6, p. 825–837. 2009.

TICE, R. R. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 35, n. 3, p. 206–

221.2000.

TSUKAMOTO, K.; JAVIER, P. C.; SHISHIDO, M.; NOGUCHI, D. *et al.* SYBR green-based real-time reverse transcription-PCR for typing and subtyping of all hemagglutinin and neuraminidase genes of avian influenza viruses and comparison to standard serological subtyping tests. **Journal of clinical microbiology**, v. 50, n. 1, p. 37-45.2012.

TWEATS, D. J. Report of the iwgt working group on strategy/interpretation for regulatory in vivo tests ii. identification of in vivo-only positive compounds in the bone marrow micronucleus test. **Mutation research**, 3 fev. 2007. v. 627, n. 1, p. 92–105.

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

VILLELA, I.V. *et al.* Bioensaios para o monitoramento de genotoxicidade ambiental. Da Silva J, Erdtmann B & Henriques JAP (eds) **Genética Toxicológica**. Editora Alcance, 2003. p. 307-321.

VIVEK KUMAR, P. R.; CHERIYAN, V. D.; SESHADRI, M. Could a strong alkali deproteinization replace the standard lysis step in alkaline single cell gel electrophoresis (comet) assay (ph>13). **Mutation research**, ago. 2009. v. 678, n. 1, p. 65–70.

WILSON, M. H.; GRANT, P. J.; HARDIE, L. J.; WILD, C. P. Glutathione S-transferase M1 null genotype is associated with a decreased risk of myocardial infarction. **The FASEB Journal**, v. 14, n. 5, p. 791-796. 2000.

9. ANEXO

9.1. PCR em tempo real

A PCR em Tempo Real foi documentada pela primeira vez em 1993 por Higuchi e permite fazer em simultâneo a amplificação, detecção ou quantificação do

produto, eliminando a necessidade da manipulação dos produtos amplificados (LALLEMAND *et al.* 2000;GINZINGER, 2002). Como em uma PCR convencional apresentam as três fases características: a fase de crescimento exponencial, fase de crescimento linear e fase estacionária(BUCHARD *et al.*2007; OLIVEIRA, T. M. S., 2010).

A primeira fase é bastante específica e precisa. Na fase de crescimento linear os produtos da reação são consumidos e iniciam o processo de degradação. A fase estacionária corresponde ao final da análise devido ao elevado nível de degradação dos produtos da PCR. Os compostos fluorescentes adicionados ao DNA geram um sinal de fluorescência que é diretamente proporcional à quantidade de produto amplificado ao longo das diferentes fases (OLIVEIRA, T. M. S., 2010). Porém esse método combina a tecnologia de amplificação por PCR com a detecção do produto em tempo real através do uso de corantes fluorescentes no mesmo tubo de reação (PONCHEL *et al.* 2003; BOEHM *et al.* 2004).

A PCR em tempo real (RQ-PCR) é uma metodologia que permite a quantificação dos produtos de amplificação gênica em todas as fases de uma reação de PCR (GINZINGER, 2002) e requer uma plataforma de instrumentação que contém um termociclador acoplado a um sistema ótico para a excitação da fluorescência e captura da emissão, além de um computador para aquisição de resultados e análise final da reação(FADERL *et al.*2004; CHANG *et al.*2010).

A curva inicial da PCR em Tempo Real começa com o *baseline* que é o sinal de fluorescência de fundo (*background*) emitido durante os primeiros ciclos, antes da amplificação dos produtos de PCR. Em seguida ocorre o ciclo *threshold* C_T indicando o número de ciclos necessários para a detecção da fluorescência. Ultrapassando a linha *threshold*, trata-se de um ponto a partir do qual a fluorescência detectada excede o limiar da fase exponencial, definido automática e arbitrariamente pelo software do equipamento em função da *baseline*. O valor mínimo de C_T é dependente da quantidade de moléculas presente no início do processo de amplificação, o que significa que um menor número de moléculas, representa, inicialmente, um maior número de ciclos requeridos para gerar um aumento exponencial do sinal da

fluorescência que seja significativamente superior à *baseline* (MACKAY, 2007; VAN PELT-VERKUIL *et al.* 2008; KUMAR *et al.* 2011) (Figura G).

A fase exponencial se dá com o aumento da quantidade de produtos formados (*amplicons*) e o sinal de fluorescência aumenta exponencialmente, atingindo a fase *plateau*, que corresponde aos ciclos finais da reação. Esta fase de *plateau* é alcançada pela limitação dos reagentes, inativação da polimerase ou redução da eficiência da reação (GRUBER *et al.* 2001; PONCHEL *et al.* 2003; BOEHM *et al.* 2004; KUBISTA *et al.* 2006) (Figura G).

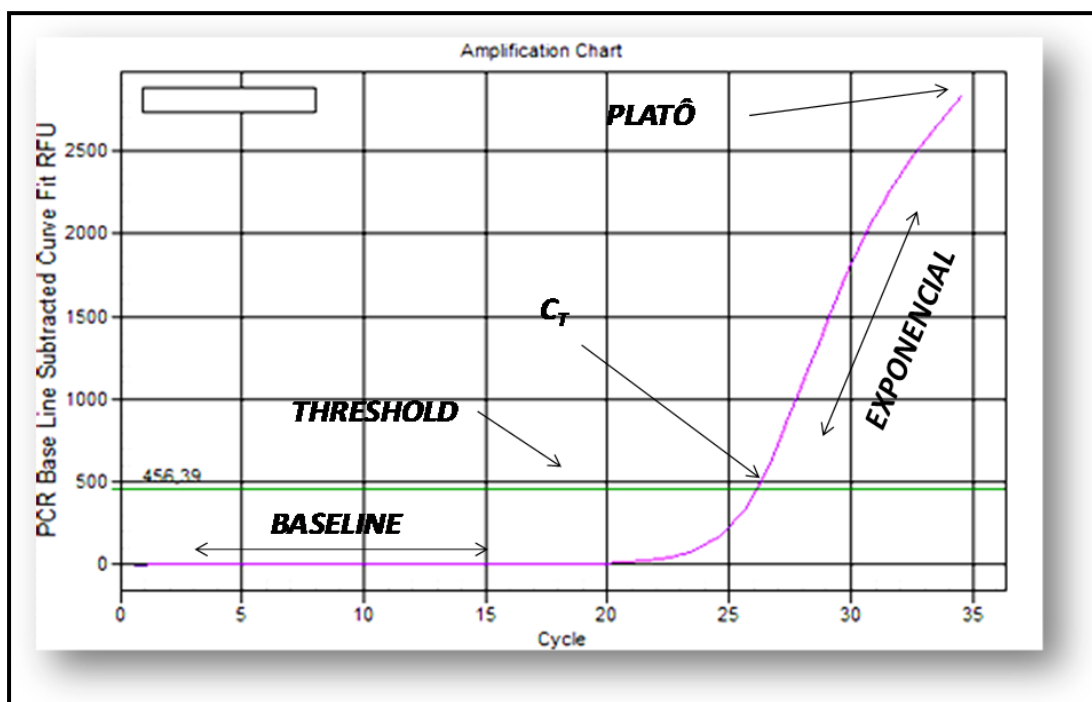


Figura G. Curva de amplificação da pcr em tempo real: c_t – ciclo *threshold*. Mostrando as três fases distintas: *baseline*, exponencial e *plateau*.

O SYBR® *Green* é uma molécula intercalante da fita dupla de DNA, tornando-o fluorescente. As vantagens de sua utilização incluem o fácil manuseio e o baixo custo, comparado a outras tecnologias de PCR em Tempo Real (TSUKAMOTO *et al.* 2012; VAN POUCKE *et al.* 2012). Durante os ciclos consecutivos de PCR, a quantidade de DNA de dupla fita se eleva de maneira exponencial, aumentando assim

a quantidade de *SYBR Green* ligado e sua fluorescência (Figura H)(ANNIBALLI *et al.* 2012).

A tecnologia *SYBR® Green* apresenta como principais vantagens a grande sensibilidade, o reduzido custo e a facilidade de manuseio. Em contrapartida, apresenta como principal desvantagem a possibilidade de ligação a todo o DNA em cadeia dupla, durante a reação de polimerização, incluindo os dímeros de iniciadores e outros produtos não específicos, o que se pode traduzir numa subestimação da concentração do fragmento alvo (VAN POUCKE *et al.* 2012). Além disso, a detecção com *SYBR® Green* exige uma otimização extensiva, uma vez que não é específico para uma determinada sequência de DNA. Desta forma, torna-se imperativo o acompanhamento dos ensaios de forma a validar os resultados (MACKAY *et al.* 2007; Oliveira 2009).

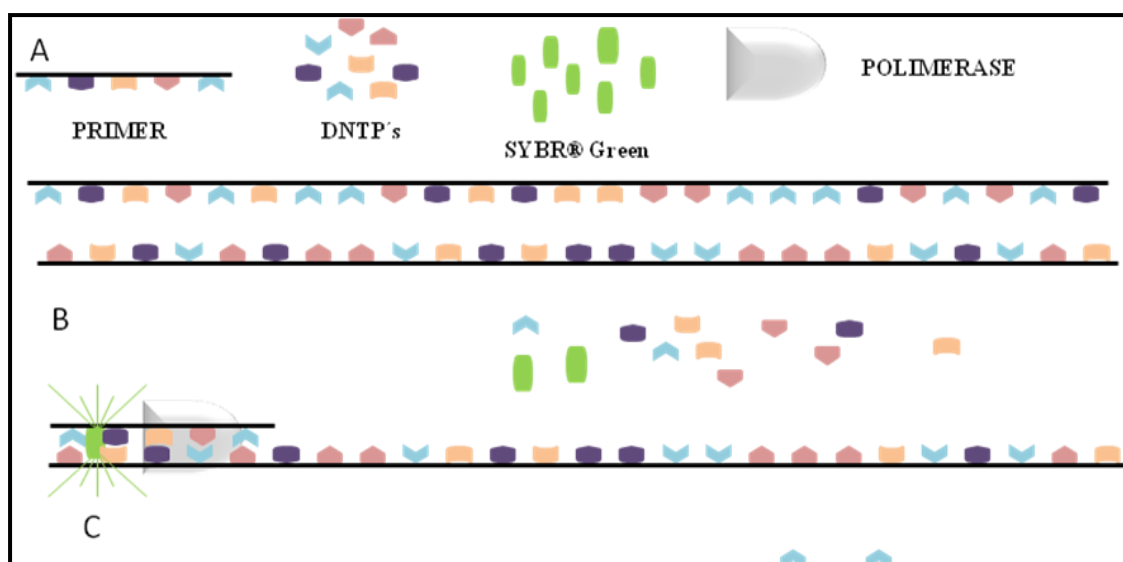


Figura H. Figura esquemática de uma reação de rq-pcr (a) reagentes e uma fita de DNA desnaturada, (b) início da reação da taq polimerase mostrando o intercalameto do corante *sybr® greenna* fita dupla de dna da região alvo, iniciada pelo primer,(c) aumento da fluorescência conforme o fragmento (*osamplicons*) são formados (OLIVEIRA, t. M. D. S., 2010).



9.2. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Dados de identificação

Título do Projeto: Estudos Estocásticos da Exposição Ocupacional a Pesticidas em Municípios Goianos com Intensa Atividade Agrícola

Pesquisadores Responsáveis: Wanessa Fernandes Carvalho e Daniela de Melo e Silva

Eu, _____,
RG nº _____, Nacionalidade _____ Idade _____,
Endereço _____ estou
sendo convidado a participar de um estudo denominado: **Estudos Estocásticos da Exposição Ocupacional a Pesticidas em Municípios Goianos com Intensa Atividade Agrícola**, cujos objetivos e justificativas são: realizar um estudo molecular de trabalhadores agrícolas de municípios goianos, expostos ocupacionalmente a pesticidas, avaliando os efeitos biológicos dessa exposição, a fim de verificar prováveis alterações genéticas, analisando também o tempo e os tipos de agrotóxicos mais utilizados pelos trabalhadores. O presente estudo contribuirá 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. Assim, compreender os aspectos biológicos subjacentes à exposição do sistema celular humano aos agrotóxicos permitirá uma maior proteção da saúde de trabalhadores agrícolas.

A minha participação no referido estudo será no sentido de doar voluntariamente, uma amostra de sangue, para colaborar com a investigação dos efeitos biológicos da exposição ocupacional 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 da Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC-GO).



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.

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 Wanessa Fernandes Carvalho e Daniela de Melo e Silva, e com eles poderei manter contato pelos telefones: (62) 8190-4000 (Wanessa) 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

9.3. Questionário

Estudos Estocásticos da Exposição Ocupacional a pesticidas em Municípios Goianos com Intensa Atividade Agrícola

- 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 Cívil: 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 Toturas

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:

Pesquisadora Responsável: Daniela de Melo e Silva – (62) 99549691

9.4.Declaração



**PUC
GOIÁS**

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

Av. Universitária, 1.069 • 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.

9.5. Produção científica: Evaluating genomic damages and GSTM1 and GSTT1 polymorphisms in rural workers occupationally exposed to pesticides: A case-control study in an agropastoral Brazilian state.

Elsevier Editorial System(tm) for Chemosphere
Manuscript Draft

Manuscript Number: CHEM31208

Title: Evaluating genomic damages and GSTM1 and GSTT1 polymorphisms in rural workers occupationally exposed to pesticides: A case-control study in an agropastoral Brazilian state

Article Type: Research Paper

Section/Category: Environmental Toxicology and Risk Assessment

Keywords: Pesticides; polymorphisms; intoxication; genotypes; DNA damage.

Corresponding Author: Dr. Daniela de Melo e Silva, PhD

Corresponding Author's Institution: Universidade Federal de Goiás

First Author: Wanessa F Carvalho, Master of Science

Order of Authors: Wanessa F Carvalho, Master of Science; Macks W Gonçalves, Master of Science; Angela A da Silva Reis, Ph.D.; Cristiano L Ribeiro, Master of Science; Fernanda R Godoy, Master of Science; Alex S Cruz, Master of Science; Caroline O Araujo Melo, Master of Science; Aparecido D Da Cruz, Ph.D.; Rogerio P Bastos, Ph.D.; Daniela de Melo e Silva, PhD

Cover Letter

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL
NÚCLEO DE PESQUISAS REPLICON

December 15th, 2013

Dear Editor,

We are sending the paper: "Evaluating *GSTM1* and *GSTT1* polymorphisms and genomic damages in rural workers occupationally exposed to pesticides: A case-control study in a agropastoral Brazilian state". This study was conducted in Central Brazil, with a formal consent of all the participants (exposed and control groups). We would like to inform that all the coauthors fully participated in and accept responsibility.

Thanks a lot for this opportunity.

Regards,

Daniela de Melo e Silva
E-mail: silvadanielamelo@gmail.com
Tel/Fax: 55 (62) 3521-1109

Corresponding author

Dr. J. de Boer
Editor-in-Chief

Highlights (for review)

Paper Highlights

1. Both genomic damage and micronuclei frequency are directly related to occupational exposure to pesticides,
2. The frequency distribution of GSTM1 and GSTT1 null in the case group was observed in 43.66% and 12.21%, respectively;
3. Individuals exposed to pesticides that presented the GSTT1 null genotype had the highest values of the three comet assay parameters, as the highest micronucleus and binucleated frequencies.

*Manuscript

[Click here to view linked References](#)

1

1 Evaluating genomic damages and *GSTM1* and *GSTT1* polymorphisms in rural workers
2 occupationally exposed to pesticides: A case-control study in an agropastoral Brazilian
3 state

4

5 Wanessa Fernandes Carvalho¹; Macks Wendhel Gonçalves², Angela Adamski da Silva
6 Reis²; Cristiano Luiz Ribeiro¹; Fernanda Ribeiro Godoy¹; Alex Silva Cruz¹; Caroline
7 Oliveira de Araújo Melo¹; Aparecido Divino da Cruz¹; Rogério Pereira Bastos²; Daniela
8 de Melo e Silva²

9

10 ¹Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Departamento de Biologia, Núcleo de
11 Pesquisas Replicon, Rua 235, n. 40, Departamento de Biologia, Bloco L, Área
12 IV, Setor Universitário, Goiânia, GO, Brazil. Cep: 74605-050.

13 ²Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas, Campus
14 Samambaia, Goiânia, GO, Brazil. Cep: 74001-970.

15

16

17

18

19

20

21

22

23 **Corresponding Author:**

24 Daniela de Melo e Silva

25 Universidade Federal de Goiás

26 Instituto de Ciências Biológicas

27 Departamento de Biologia, Campus Samambaia

28 Tel: 62-35211109

29 Fax: 62- 35211109

30 Goiânia – Goiás (Brazil) CEP: 74001-970

31 E-mail: silvadanielamelo@gmail.com

32

33

34

35

36 Abstract

37 We analyzed 139 individuals, consisting of 71 individuals occupationally exposed to
38 pesticides and 68 of the control group, which had ethnic and socio-environmental
39 similarities. To evaluate mutagenic and genomic potential of pesticides we collected
40 oral cavity and whole blood for micronucleus test and comet assay, respectively. We
41 collected whole blood sample to analyze the GSTT1 and GSTM1 polymorphisms by
42 real time PCR (qPCR), showing the specific melting curves for both loci. We observed
43 a statistically significant difference between the exposed and control ($p<0.001$) groups
44 for comet assay's parameters, frequency of micronuclei and binucleated cells. Thus, our
45 results demonstrated that, both genomic damages and micronuclei frequency are
46 directly related to occupational exposure to pesticides. The frequency distribution of
47 GSTM1 and GSTT1 null genotypes in the exposed group was observed in 43.66% and
48 12.21%, respectively. The control group showed deletion of GSTM1 in 39.70% of
49 subjects, and in the GSTT1, 29.41% of patients presented a deletion; hence, there was
50 an increased risk of intoxication for the null genotypes. By comparing the molecular
51 analysis with mutagenic and genotoxic damages, in exposed and control groups, it was
52 not found to be statistically significant. However, individuals exposed to pesticides that
53 presented the GSTT1 null genotype had the highest values of the three comet assay
54 parameters, as the highest micronucleus and binucleated frequencies. So, the genetic
55 monitoring should be considered as part of good medical supervision in people in direct
56 contact with pesticides, since it allows evaluating the potential risk of occupational
57 exposure, making possible the implementation of measures for the early identification
58 of genetic risk.

59

60 Keywords: Pesticides; polymorphisms; intoxication; genotypes; DNA damage.

61

62

63

64

65

66

67 1. Introduction

68 Knowledge about the genotoxicity of pesticides used on cultures is of the utmost
69 importance, because many of these substances cause DNA damage, which can trigger
70 the processes of carcinogenesis and morphological abnormalities, or alterations in the
71 gametes, influencing the survival and fertility of the populations (Bolognesi, 2003). The
72 genetic alteration in individuals exposed to pesticides can be used as a marker of an
73 early biological effect, providing an overall structure of pesticide exposure (Norppa et
74 al., 2004).

75 Besides those tests, it has been used as a biomarker of exposure, effect, and
76 susceptibility (Silins and Hogberg, 2011). Individual differences, particularly in
77 conditions of exposure to pesticides, (both occupational and environmental) can alter
78 the risk of intoxication. This individual susceptibility, determined by the polymorphism
79 of several genes, is one of the factors that determines the individual differences in
80 response to a particular xenobiotic and plays an important role in response to exposure
81 to pesticides. Any polymorphism that affects xenobiotic metabolism and cellular
82 response to DNA damage can alter the individual's sensitivity to carcinogens (Norppa,
83 2004).

84 The GSTM1 and GSTT1 genes are members of the multigene GST super-
85 family, and they are commonly used as biomarkers of susceptibility. These genes have
86 received much attention due to the high prevalence of exclusions resulting in a null
87 genotype with a reduced ability to detoxify carcinogenic compounds, which results in
88 individuals with an increased risk of developing tumors (Kumar et al., 2012). The
89 enzymes encoded by these genes are involved in phase II of metabolism, and they
90 participate in detoxifying a wide range of compounds, including xenobiotics, pesticides,
91 and environmental and chemotherapeutic compounds (Abbas et al., 2004).

92 For detection of genetic alteration, the following have been used: (a) comet
93 assay, also known as a single cell gel electrophoresis' (SCGE), which may be performed
94 in any nucleated eukaryotic cell, in addition to being a simple test that is also rapid,
95 sensitive, and relatively low cost; (b) a micronucleus test, which is a cytogenetic
96 analysis that can indicate the potential mutagenicity of chemicals in order to evaluate the
97 effect of various genotoxic agents. In this context, the aim of this study was to evaluate
98 the genotoxic and mutagenic effects of occupational exposure to pesticides and to verify

99 the polymorphic variability of GSTM1 and GSTT1 in individuals exposed to pesticides
100 in municipalities in the state of Goiás, which contains intense agricultural activity. This
101 study tried to associate the GSTT1 and GSTM1 polymorphisms to genomic damages, in
102 individuals exposed to pesticides, at Goiás state, complementing another recent study
103 carried out by our group (Khayat et al., 2013).

104

105 2. Material and Methods

106

107 2.1. Study group

108

109 This study was a case-control type. We analyzed 139 individuals, consisting of
110 71 individuals occupationally exposed to pesticides and 68 of the control group, which
111 had ethnic and socio-environmental similarities. Data such as age, social habits,
112 exposure time, and types of pesticides were recorded in a questionnaire that focused on
113 lifestyle. The 71 samples of rural workers occupationally exposed to pesticides were
114 collected in 10 municipalities of the state of Goiás (Figure 1). This study was approved
115 by a committee for human subjects from Pontifical Catholic University of Goiás state
116 (Protocol number 1978/2011) and all the participants signed a formal term of consent.

117 2.2. Micronucleus assay

118 Exfoliated buccal mucosa cells were collected using a cytobrush moistened with
119 A buffer to gently scrape the mucosa of the inner lining of both cheeks in order to
120 determine the frequency of micronuclei (MN), as suggested by Lubin and Boice,
121 Jr.(1997). The cytobrush that had been used to collect buccal cells was shaken in a
122 centrifuge tube containing saline solution to release the cells, and the tube was
123 centrifuged to wash the cells in a fixative . The cells were then transferred to slides by
124 dropping them with a pipette followed by fixation. Then, the slides were stained with
125 Feulgen-Fast Green (FFG), and two slides were prepared for each subject. We analyzed
126 2.000 cells in each case in a light microscope with a 100x increase.

127

128

129 2.3. Alkaline Comet Assay

130

131 The alkaline comet assay methodology was carried out, according to Falck et al.
132 (1999), with slight modifications. Cells were suspended in 0.7% low-melting-point
133 agarose in PBS (Saline phosphate buffer) [pH 7.4] at 37°C and 80 µL LMP agarose with
134 20 µL cells pipetted onto a microscope slide precoated with 100 µL of 1% agarose. The
135 agarose was allowed to be set on ice for 5 min, and the slide was immersed in a lysis
136 solution (2.5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 10 mM Tris, NaOH to pH 10 ± 0.5, and 1%
137 Triton X-100) for 1 h at 4°C to remove cellular proteins. The slides were placed in an
138 electrophoresis tank containing 0.3 M NaOH and 1 mM Na₂EDTA (pH > 13) for 20 min.
139 Electrophoresis was performed at 25 V (1 V/cm, 300 mA) for 20 min at an ambient
140 temperature of 4°C. Two slides were processed for each sample, including negative and
141 positive (H₂O₂ 50 µM) controls. The cell nuclei were visualized using a 10X objective,
142 and the fluorescent image was captured using the ISIS® software analyzing two slides
143 for each individual. We counted, at random, 50 cells totaling 100 cells per individual,
144 which were analyzed by the Comet score version 1.5. We considered for the analysis of
145 the Comet assay four parameters related to genomic damage: tail length (TL), percentage
146 of DNA in the tail (% DNA T) and Olive tail moment (OTM).

147

148 2.4. Molecular analysis

149

150 Genomic DNA samples were obtained from blood lymphocytes using an *Illustra*
151 *Genomic Blood M S*® (GE, EUA), according to the manufacturer's protocol. Then, the
152 extracted samples were quantified using the equipment NanoVue™ Plus™ (GE -
153 USA), following the manufacturer's recommendations. After the quantification, the
154 DNA samples were diluted to a final concentration of 10 ng of DNA. Then, the samples
155 were stored at -20°C until the time of use. Fragments of *GSTT1*
156 (F: TTCCTTACTGGTCCTCACTCTC; R: TCACCGGTCATGGCCAGCA), *GSTM1*
157 (F: GAAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC; R: GTTGGGCTAAATATACGGTGG), and
158 *RH92600* (F: TCATATGCAAAACAGCTTCCC;
159 R: CTGGTCCTTCAAGCCTGTATG) genes, the last of which was used as an internal
160 amplification control to exclude false negatives, were simultaneously amplified. The

161 primers and the PCR conditions were previously suggested by Marin et al. (2010)
162 (*GSTM1 e GSTT1*) and *RH92600* Abdel-Rahma et al.(1996). For the PCR
163 reaction, we used SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems®, USA). The
164 volume used for each PCR was 25µL of 0,8 X containing Master Mix, 1 mM
165 magnesium chloride, 0,32 µM of primers, and DNA 10ng/µL. General PCR conditions
166 were initial denaturation at 95°C for 10 minutes and 35 cycles of 95°C for 10 s, 60°C
167 for 20 s, and 72°C for 25 s. The program for the melting curve analysis was as follows:
168 65°C for 10 s, and then ramping to 97.2°C at 0.2°C/s transition rate.

169

170 2.5. Statistical Analysis

171

172 Life habits of the exposed group-as well as age, time of exposure, smoking, and
173 alcohol consumption-were correlated with the frequency of the micronucleus and
174 frequencies of the binucleate cells with genomic damage, which were assessed by the
175 comet assay. The significance association was evaluated using the chi-square test, *t*-
176 test's Student. All of the tests were conducted with a significance level of $p < 0.05$, using
177 the SPSS Version 20.0.

178

179 3. Results

180

181 The average of the age of the subjects who participated in the control group was
182 41.98 ± 15.99 and 39.90 ± 13.36 for the exposed group (Table 1). Regarding the
183 demographic characteristics of the rural workers occupationally exposed to pesticides
184 showed that of the 71 workers, 91.5% were men, 53.5% were older than 40 years,
185 84.5% were non-smokers, 63.4% consumed alcohol, 53.52% of workers reported not
186 using PPE constants during the application and/or preparation of such compounds, and
187 56.33% had been intoxicated during the use of pesticides. Approximately 52.11% of
188 workers reported being exposed to pesticides for more than 15 years (Table 1). Chi-
189 square test was applied to evaluate if there were difference in sex, age and consumption
190 habits.

191

192 In 61.98% of the workers were exposed to only one pesticide; among these
pesticides are glyphosate and carbofuran. The pesticide identified as glyphosate was

193 responsible for 56.34% of use among workers. In this study, (27) 38.03% of workers
194 reported applying/handling more than one of these chemical compounds. Intoxications
195 were reported by 30 (42.25%) of respondents, whose main signs were as follows, body
196 aches, dizziness, irritability, malaise, tremors, vertigo, burning in the nose, body aches,
197 nausea, and malaise. Of all of the workers who reported signs of intoxication, 38 more
198 than half (53.52%) did not use PPE.

199 The study demonstrated a statistically significant difference in relation to the
200 three parameters of the comet assay and micronucleated/binucleated cell in the different
201 variables of the exposed group (Tables 2). All comet assays parameters are measured in
202 arbitrary units (A.U.).

203 Student *t*-test was applied for comparing mean value between age, time of
204 exposure, consumption habits, use of PPE's and historic of intoxication for which of
205 comet parameters and micronucleated/binucleated cells.

206 For workers who did not use PPE, the genomic damage estimation in the tail
207 length was 0.82 ± 0.99 , for the % of DNA in the tail 0.78 ± 0.94 and 1.06 ± 0.20 for
208 the Olive tail moment. Statistically significant differences were also observed in the data
209 of the micronucleus test, which found an average of 5.42 ± 7.32 of micronuclei and
210 10.37 ± 8.66 of binucleated cells, indicating that the use of PPE may protect against
211 pesticides, as shown in Table 2 ($p < 0.001$).

212 The data length of the tail length, % of DNA in tail and the Olive tail moment
213 showed statistically significant differences regarding the time of exposure to pesticides.
214 Analyzing the cells of the oral mucosa of the rural workers exposed to pesticides for
215 more than 15 years, we found that they showed an increase of binucleated cells $14.16 \pm$
216 13.15 and micronuclei 5.08 ± 8.15 .

217 In 71 of rural workers exposed to pesticides, 40 (56.33%) reported events of
218 intoxication. In evaluating and comparing, using the comet assay, workers who claimed
219 to be poisoned by the misuse of pesticides with those who never experienced symptoms
220 of poisoning, a relative increase compared to genomic damage index for the parameters
221 tail length (0.94 ± 0.97), % of DNA in the tail (0.95 ± 0.72) and Olive tail moment (0.47
222 ± 0.84) could be verified, thus confirming statistically significant differences between
223 groups ($p < 0.001$). However, there was no significant difference in the frequency of

224 micronuclei and binucleated cells among workers who related events of intoxication
225 (Table 2).

226 By analyzing the exposed and control group we observed a statistical difference
227 ($p < 0.001$) for the parameters tail length, % of DNA in tail, tail moment of Olive (Figure
228 2, Table 3), frequency of micronuclei and binucleated cells. This means that both
229 genomic damage and micronuclei frequency are directly related to occupational
230 exposure to pesticides. Student *t*-test was applied for comparing mean value between
231 the control and exposed group.

232 The frequency distribution of GSTM1 and GSTT1 null in the case group was
233 observed in 43.66% and 12.21%, respectively. The control group showed deletion of
234 GSTM1 in 39.70% of subjects, and in the GSTT1, 29.41% of patients presented a
235 deletion; however, there was an increased risk of intoxication for the null genotypes.
236 By comparing the molecular analysis with mutagenic and genotoxic damage, in
237 exposed and control groups, it was not found to be statistically significant (Table 4).
238 However, as shown in Table 4, individuals that present the GSTT1 null genotype
239 presented the highest values of the three comet assay parameters, as the highest
240 micronucleus and binucleated frequencies, when compared the exposed and control
241 groups.

242

243 4. Discussion

244 Brazil is a world leader in pesticide consumption, and exogenous intoxications
245 are the most visible damage on human health (Khayat et al., 2013). The use of
246 pesticides has brought a number of consequences for the environment, and especially
247 the health of rural workers. These are conditioned by factors that are closely related,
248 such as the inappropriate use of these substances, the high toxicity of certain products,
249 the lack of use of personal protective equipment and insecurity surveillance. However,
250 none of the information systems that record officers' poisoning cases responds
251 appropriately to the role of the surveillance system.

252 In this study, more than half of the 38 (53.52%) agricultural workers who
253 reported signs of intoxication were not using PPE. Glyphosate was the most frequently
254 used herbicide in this study and was also causing major signs of poisoning among rural
255 workers. In this study, due to the variety of chemical compounds used, the reports of

256 intoxication could not be attributed only to a chemical compound. In addition, the health
257 problem most reported by rural workers was headache. Although this can hardly be of
258 organic origin, the headaches are often associated with the use of pesticides, probably
259 because they are an alert symptom of the body that usually affects the worker after
260 exposure to a high concentration of pesticide

261 The chronic character of exposure to pesticides has been observed in studies in
262 Croatia, using the comet assay, which showed an increase of genetic damage in workers
263 exposed to pesticides when compared to controls (Garaj-Vrhovac and Zeljezic, 2000).
264 When assessing workers of soybean cultivation by conducting a micronucleus test,
265 Bortoli et al. (2009) also showed an increase in the number of micronuclei in workers
266 exposed to pesticides ($p < 0.05$); however, the use of PPE did not influence the number
267 of micronuclei. This information is justified by the authors as a gap between what was
268 reported in the study and the reality of the working conditions.

269 Additionally, increases of micronuclei and binucleated cells in populations living
270 in areas contaminated by pesticides in Turkey were reported (Ergene et al., 2007).
271 Pesticide industry workers are also highly exposed to genetic damage, evidenced by the
272 increase in micronuclei in this class of professionals (Sailaja et al., 2006).

273 In this study, factors such as age, smoking, alcohol consumption, and exposure
274 to pesticides did not affect the number of micronuclei in binucleated cells and in
275 parameters related to genomic damage analysis at the comet assay, as demonstrated by
276 other groups (Bortoli et al., 2009; Ergene et al., 2007; Martínez-Valenzuela et al., 2009;
277 Sailaja et al., 2006).

278 Brazilian research on the impact of pesticide use on human health has also
279 grown in recent years, but it is still insufficient to establish the extent of the effects of
280 exposure and the extent of damage to health from the use of pesticides. One such
281 problem is the lack of information on the use of pesticides and insufficient data on
282 poisoning that occurs from these products. Biomarkers can be used for various
283 purposes, depending on the purpose of the study and the type of exposure (Abhishek et
284 al., 2010).

285 Many studies have shown the influence of susceptibility of biomarkers in levels
286 of exposure and effects in occupationally exposed populations (Heuser, 2007). The
287 determination of polymorphisms is becoming an important aspect that may increase the

288 sensitivity and specificity of the tests and sensitive groups. Several polymorphisms of
289 xenobiotic that metabolize enzymes have been identified to affect the results of
290 cytogenetic biomarkers, as they are able to activate or inactivate potentially genotoxic
291 and carcinogenic compounds. The metabolic activation and inactivation of genotoxic
292 agents occur, metabolizing enzymes of phase I and phase II, involving multiple
293 interactions (Singh et al., 2011). GST is highly polymorphic enzymes involved in the
294 detoxification of various xenobiotics (Giri et al., 2011).

295 The distribution of GSTM1 and GSTT1 genotypes, relative to socio-
296 epidemiological data, has been demonstrated that individuals with the GSTM1 genotype
297 present suffered the most events of intoxication due to exposure to pesticides, although
298 45% of people of this group have reported using PPE. However, there was no
299 statistically significant association between the events of intoxication and the
300 distribution of genotypes. Singh et al. (2011) suggested that the GSTT1 and GSTM1
301 null genotypes, along with DNA damage, plays an important role in identifying
302 individuals at high risk of disease due to occupational exposure to some
303 organophosphorus pesticides.

304 Therefore, our study showed no significant differences between the distributions
305 of genotype frequencies between groups exposed to pesticides and the control group.
306 Kumar et al. (2011) evaluated approximately 115 paving workers exposed to polycyclic
307 aromatic hydrocarbons and also found no significant differences in genotype
308 distribution ($p = 0.79$ GSTM1 and GSTT1 $p = .95$). Furthermore, in our study, null
309 genotypes classified as hazardous were not identified as demonstrating a statistically
310 significant association between the case and control groups. Several studies (Harada et
311 al., 1992; Kelada et al., 2000; Saadat and Saadat 2000; Hashibe et al., 2003; Abbas et
312 al., 2004; Bugano et al., 2008; Rouissi et al., 2009; Zafereo et al., 2009) has
313 demonstrated the importance of GSTM1 and GSTT1 genotype polymorphisms, either
314 separately or combined as part of development of the disease.

315 According to the data of Kumar et al. (2012), individuals exposed to polycyclic
316 aromatic hydrocarbons (PAH) with the GSTM1 null genotype showed an increased risk
317 for the development of tumors of the larynx, lung, bladder, colon, and gastrointestinal
318 tract, and individuals with the GSTT1 null genotype have an increased risk for the
319 development of brain tumors and colorectal tumors. These results indicate that the

320 GSTM1 polymorphism and the GSTT1 play an important role in human susceptibility
321 to mutagenic and carcinogenic agents, particularly because they are capable of providing
322 adequate information regarding the risk of developing cancer in the population,
323 especially in those with occupational exposure to environmental agents.

324 Epidemiological studies have shown that GSTM1 and GSTT1 polymorphisms
325 are associated with increased susceptibility to diseases related to oxidative stress, such
326 as male infertility (Parl, 2009; Bolt et al., 2006; Griffiths et al., 2010), asthma (Saadat
327 et al., 2004; Bahaoddini et al., 2009) and schizophrenia (Harada et al., 2001; Pae et al.,
328 2003; Saadat et al., 2007). The study carried out by Sun et al. (2010) showed an
329 association between null genotypes and the risk for the development of senile cataract in
330 Asians. This ethnic difference can be attributed to lifestyle, nutrition, environmental,
331 and genetic factors of each population (Sireesha et al., 2012).

332 In the present study, the association between polymorphisms of GSTM1 and
333 GSTT1 and the consumption of alcohol and tobacco was not statistically significant
334 when comparing the case and control groups and these factors did not cause increased
335 risk of pesticide poisoning. In this context, the differences between results obtained by
336 the biological monitoring of groups exposed to pesticides may reflect different exposure
337 conditions, such as the following: the magnitude of exposure, protective measures,
338 genotoxic-specific type of culture, environmental factors, endogenous factors,
339 formulation and potential for the absorption of the pesticide, and the laboratory
340 technique used. For these reasons, a genotoxic study developed in a specific
341 occupational risk condition cannot be extrapolated to other situations in which genetic
342 and occupational risks are involved (Bortoli et al., 2009; Coskun et al., 2011).

343

344 5. Conclusion

345

346 Finally, the perception of the risk of rural workers when using pesticides is often
347 overlooked and can expose workers to the risk of intoxication, as many of them fail to
348 interpret the labels and product inserts. Another problem occurs when rural workers are
349 compared to larger groups of workers exposed to risk substances; this is because issues
350 relating to rural workers have not been a priority of research in the area of health, and
351 they have not highlighted the regulatory policies in many countries, as occurs in Brazil.

352 So, with the exaggerated application of chemicals in Brazilian crops, the use of
353 pesticides is no longer an issue related specifically to agricultural production, and it is
354 becoming a public health problem, as well as an issue standing in the way of nature
355 preservation.

356

357 6. References

358

359 Abbas, A., Delvinquière, K., Lechevrel, M., Lebailly, P., Gauduchon, P., Launoy, G.,
360 Sichel, F., 2004. GSTM1, GSTT1, GSTP1 and CYP1A1 genetic polymorphisms and
361 susceptibility to esophageal cancer in a French population: different pattern of
362 squamous cell carcinoma and adenocarcinoma. *World J. Gastroenterol.* 10, 3389-3393.

363

364 Abdel-Rahman, S.Z., El-Zein, R.A., Anwar, W.A., Au, W.W., 1996. A multiplex PCR
365 procedure for polymorphic analysis of GSTM1 and GSTT1 genes in population studies.
366 *Cancer Lett.* 107, 229-233.

367

368 Abhishek, S., Kaur, N., Kaur, S., Lata, M., Sharmam, J., Sharmam, A., 2010.
369 Association of GSTM1 and GSTT1 gene deletions with susceptibility to DNA damage
370 in the pesticide-exposed workers of Punjab. *Rejuvenation Res.* 13, 281-284.

371

372 Bolognesi, C., 2003. Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring
373 studies. *Mutation Research/Reviews in Mutat Res.* 543, 251-272.

374

375 Bolt, H., Their, R., 2006. Relevance of the deletion polymorphisms of the glutathione S-
376 transferases GSTT1 and GSTM1 in pharmacology and toxicology. *Curr. Drug. Metab.* 7,
377 613-628.

378

379 Bortoli, G.M., Azevedo, M.B., Silva, L.B., 2009. Cytogenetic biomonitoring of
380 Brazilian workers exposed to pesticides: Micronucleus analysis in buccal epithelial cells
381 of soybean growers. *Mutat. Res.* 675, 1-4.

382

- 383 Bugano,D., Conforti-Froes, N., Yamaguchi, N., Baracat, E., 2008. Genetic
384 polymorphisms, the metabolism of estrogens and breast cancer: a review. Eur.
385 J.Gynaecol.Oncol. 29, 313.
386
- 387 Coskun, M., Cayir, A., Ozdemir, O., 2011. Frequencies of micronuclei (MNi),
388 nucleoplasmic bridges (NPBs), and nuclear buds (NBUDs) in farmers exposed to
389 pesticides in Çanakkale, Turkey. Environ. Int. 37, 93-96.
390
- 391 Ergene, S., Celik,A., Cavas, T., Kaya, F., 2007. Genotoxic biomonitoring study of
392 population residing in pesticide contaminated regions in Göksu Delta: Micronucleus,
393 chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges.Environ. Int. 33, 877-885.
394
- 395 Falck,G., Hirvonen,A., Scarpato, R., Saarikoski, S.T., Migliore, L., Norppa, H., 1999.
396 Micronuclei in blood lymphocytes and genetic polymorphism for GSTM1, GSTT1 and
397 NAT2 in pesticide-exposed greenhouse workers. Mutat. Res. 441, 225.
398
- 399 Garaj-Vrhovac, V., Zeljezic, D., 2000. Evaluation of DNA damage in workers
400 occupationally exposed to pesticides using single-cell gel electrophoresis (SCGE) assay
401 Pesticide genotoxicity revealed by comet assay. Mutat.Res. 469, 279-285.
402
- 403 Giri, S.K., Anita, Y., Kumar, A., Dev, K.,Gupta, R., Aggarwal, N., Gautam, S., 2011.
404 Association of GSTM1 and GSTT1 polymorphisms with DNA damage in coal-tar
405 workers. Sci. Total Environ.409, 4465-4469.
406
- 407 Griffiths, B., Ball, B., Daniell, T., Hallett, P., Neilson, R., Wheatley, R., Bohanec, M.
408 2010. Integrating soil quality changes to arable agricultural systems following organic
409 matter addition, or adoption of a ley-arable rotation. Appl.Soil. Ecol.46, 43-53.
410
- 411 Harada, S., Tachikawa, H., Kawanishi, Y.. 2001. Glutathione S-transferase M1 gene
412 deletion may be associated with susceptibility to certain forms of schizophrenia.
413 Biochem.Biophys. Res. Commun. 281, 267-271.
414

- 415 Harada, S., Misawa, S., Nakamura, T., Tanaka, N., Ueno, E., Nozoe, M., 1992.
416 Detection of GST1 gene deletion by the polymerase chain reaction and its possible
417 correlation with stomach cancer in Japanese. *Hum. Genet.* 9, 62-64.
418
- 419 Hashibe, M., Brennan, P., Strange, R.C., Bhisey, R., Cascorbi, I., Lazarus, P., Ophuis,
420 M.B.O., Benhamou, S., Foulkes, W.D., Katoh, T., 2003. Meta-and pooled analyses of
421 GSTM1, GSTT1, GSTP1, and CYP1A1 genotypes and risk of head and neck cancer.
422 *Cancer. Epidem. Biomar.* 12, 1509-1517.
423
- 424 Heuser, V.D., Erdtmann, B., Kvitko, K., Rohr, P., da Silva, J., 2007. Evaluation of
425 genetic damage in Brazilian footwear-workers: Biomarkers of exposure, effect, and
426 susceptibility. *Toxicology.* 232, 235-247.
427
- 428 Kelada, S.N., Kardia, S.L., Walker, A.H., Wein, A.J., Malkowicz, S.B., Rebbeck, T.R.,
429 2000. The glutathione S-transferase- μ and- θ genotypes in the etiology of prostate
430 cancer: genotype-environment interactions with smoking. *Cancer Epidem. Biomar.* 9,
431 1329-1334.
432
- 433 Khayat, C.B., Costa, E.O., Gonçalves, M.W., da Cruz E Cunha, D.M., da Cruz, A.S., de
434 Araújo Melo, C.O., Bastos, R.P., da Cruz, A.D., de Melo E Silva, D., 2013. Assessment of
435 DNA damage in Brazilian workers occupationally exposed to pesticides: a study from
436 Central Brazil. *Environ Sci. Pollut. Res. Int.* 20 (10), 7334-40.
437
- 438 Kumar, A., Yadav, A., Giri, S.K., Dev, K., Gautam, S.K., Gupta, R., Aggarwal, N.,
439 2011. Effect of genetic polymorphism of GSTM1 and GSTT1 genotypes on cytogenetic
440 biomarkers among coal tar workers. *Environ Toxicol. Pharmacol.* 32, 128-135.
441
- 442 Kumar, A., Yadav, A., Giri, S.K., Dev, K., Gulati, S., Gautam, S.K., Gupta, R.,
443 Aggarwal, N., 2012. Allelic variation of GSTM1 and GSTT1 genes in Haryana
444 population. *Gen Med Biomar. Health. Sci.* 4 (3), 98-102.
445

- 446 Lubin, J.H., Boice, Jr. J.D., 1997. Lung cancer risk from residential radon: meta-analysis
447 of eight epidemiologic studies. *J. Nat. Can. Inst.* 89, 49-57.
448
- 449 Norppa, H., 2004. Cytogenetic biomarkers and genetic polymorphisms. *Toxicol. Lett.*
450 149, 309.
451
- 452 Pae, C.U., Kim, J.J., Lee, S.J., 2003. Association study between glutathione S-
453 transferase P1 polymorphism and schizophrenia in the Korean population. *Prog. Neuro.*
454 *Psychoph.* 27, 519-523.
455
- 456 Parl, F., 2009. A need for true GSTM1 and GSTT1 genotyping. *Cancer Epidem.*
457 *Biomar.* 18, 2793.
458
- 459 Rouissi, K., Ouerhani, S., Marrakchi, R., Slama, M.B., Sfaxi, M., Ayed, M., Chebil, M.,
460 El-Gaaied, A.B., 2009. Combined effect of smoking and inherited polymorphisms in
461 arylamine N-acetyltransferase 2, glutathione S-transferases M1 and T1 on bladder
462 cancer in a Tunisian population. *CancerGenet.Cytogenet.* 190, 101-107.
463
- 464 Saadat, M., Farvardin-Jahromi, M., Saadat, H., 2004. Null genotype of glutathione S-
465 transferase M1 is associated with senile cataract susceptibility in non-smoker females.
466 *Biochem.Biophys.Res.* 319, 1287-1291.
467
- 468 Saadat, M., Mobayen, F., Farrashbandi, H., 2007. Genetic polymorphism of glutathione
469 S-transferase T1: a candidate genetic modifier of individual susceptibility to
470 schizophrenia. *Psychiat.Res.* 153, 87-91.
471
- 472 Sailaja, N., Chandraskhar, M., Rekhadevi, P.V., Mahbood, M., Rahman, M.F., Vuyyuri,
473 S.B., Danadevi, H., Hussain, S.A., Grover, P., 2006. Genotoxic evaluation of workers
474 employed in pesticide production. *Mutat Res* 609, 74-80.
- 475 Silins, I., Högberg, J., 2011. Combined toxic exposures and human health: biomarkers of
476 exposure and effect. *Int J Environ. Res. Publ. Health.* 8, 629-47.
477

- 478 Singh, S., Kumar, V., Singh, P., Thakur, S., Banerjee, B.D., Rautela, R.S., Grover, S.S.,
479 Rawat, D.S., Pasha, S.T., Jain, S.K.,2011. Genetic polymorphisms of GSTM1, GSTT1
480 and GSTP1 and susceptibility to DNA damage in workers occupationally exposed to
481 organophosphate pesticides. *Mutat. Res. Gen. Tox. Env.*725, 36-42.
482
- 483 Sireesha, R., Laxmi, S.G., Mamata, M., Reddy,P.Y., Goud, P.U., Rao, P.V.,
484 Reddy,G.B., Vishnupriya, S., Padma, T.,2012. Total activity of glutathione-S-
485 transferase (GST) and polymorphisms of GSTM1 and GSTT1 genes conferring risk for
486 the development of age related cataracts. *Exp. Eye. Res.*98, 67-74.
487
- 488 Sun, L., Xi, B., Yu, L., Gao, X.C.,2010. Association of glutathione S-transferases
489 polymorphisms (GSTM1 and GSTT1) with senile cataract: a meta-analysis. *Invest.*
490 *Ophth. Vis. Sci.* 51, 6381-6386.
491
- 492 Zafereo,M.E., Sturgis, E.M., Aleem, S., Chaung, K., Wei, Q., Li, G., 2009. Glutathione
493 S-transferase polymorphisms and risk of second primary malignancy after index
494 squamous cell carcinoma of the head and neck. *CancerPrev.Res.*2, 432-439.

Table

[Click here to download Table: Tables Carvalho et al. Chemosphere.doc](#)

Table 1: Social demographic characteristics of the exposed and control groups

Variable	Control	Exposed	<i>p</i> value
All (n)	(68)	(71)	
Age in years (Mean ± SD)	41.98 ± 15.99	39.90 ± 13.36	<0.05
Gender n (%)			
Male	63 (92.6)	65 (91.5)	0.811
Female	5 (7.4)	6 (8.5)	
Age group n (%)			
< 40	33 (48.5)	33 (46.5)	0.809
≥ 40	35 (51.5)	38 (53.5)	
Years of exposure n (%)			
< 15		34 (47.88)	
≥ 15		37 (52.11)	
Smoking n (%)			
Smokers	7 (10.3)	11 (15.5)	0.361
Non-Smokers	61 (89.7)	60 (84.5)	
Alcohol consumption n (%)			
Drinks	21 (30.9)	45 (63.4)	<0.05
No Drinks	47 (69.1)	26 (36.6)	
Use of ppE's			
Yes		33 (46.47)	NA ^a
No		38 (53.52)	
Intoxication n (%)			
Yes		40 (56.33)	NA ^a
No		31 (43.63)	

^aNot applicable

Table 2. Results of *t*-test's Student in comet assay parameters, micronucleated and binucleated cells in the exposed group.

	n (%) ^a	TL (A.U) ^b	% DNA (A.U) ^c	OTM (A.U) ^d	MN ^e	BN ^f
Age						
< 40	32 (45.07%)	0.58 ±1.07*	0.45 ± 1.06*	0.02 ± 1.13*	3.66 ± 5.62*	10.28 ± 8.95*
≥ 40	39 (54.92%)	0.77 ± 1.02*	0.75 ± 0.97*	0.11 ± 1.14*	5.33 ± 8.04*	13.44 ± 12.68*
Years of exposure						
< 15	34 (47.88%)	0.54 ± 1.09*	0.51 ± 1.01*	0.01 + 1.09*	4.03 ± 5.69*	9.68 ± 8.14*
≥ 15	37 (52.11%)	0.82 ± 0.98*	0.71 ± 1.02*	0.08 + 1.19*	5.08 ± 8.15*	14.16 ± 13.15*
Smoking						
Smokers	11 (15.49%)	0.38 ± 1.19*	0.42 ± 1.21*	0.04 ± 1.11*	3.27 ± 3.28*	19.91 ± 14.45*
Non-Smokers	60 (84.50%)	0.74 ± 1.01*	0.65 ± 0.98*	0.03 ± 1.28*	4.82 ± 7.56*	10.57 ± 9.92*
Alcohol consumption						
Drinks	45 (63.38%)	0.58 ± 1.07*	0.47 ± 1.12*	0.02 ± 1.01*	4.84 ± 7.22*	13.49 ± 12.46*
No Drinks	26 (36.61%)	0.87 ± 0.97*	0.86 ± 0.70*	0.28 ± 0.90*	4.12 ± 6.86*	9.46 ± 8.23*
Use of ppE's						
Yes	33 (46.47%)	0.53 ± 1.09*	0.42 ± 1.07*	0.03 ± 1.02*	3.61 ± 6.71*	13.91 ± 13.41*
No	38 (53.52%)	0.82 ± 0.99*	0.78 ± 0.94*	0.20 ± 1.06*	5.42 ± 7.32*	10.37 ± 8.66*
Intoxication						
Yes	40 (56.33%)	0.94 ± 0.97*	0.95 ± 0.72*	0.47 ± 0.84*	4.00 ± 5.49*	9.10 ± 9.34*
No	31 (43.63%)	0.49 ± 1.06*	0.36 ± 1.14*	0.04 ± 1.20*	5.03 ± 8.10*	14.27 ± 12.08*

^a number of individuals; ^b tail length; ^c % of DNA in the tail; ^d Olive tail moment; ^e micronucleus; ^f binucleated; **p* < 0.01.

Table 3: Comet assays parameters in the control and exposed values. All comet assay's parameters are measured in arbitraries units (A.U.).

Parameters	Control	Exposed	<i>p</i> value
	Mean \pm SD	Mean \pm SD	
TL (A.U) ^a	3.77 \pm 2.21	14.23 \pm 12.93	< 0.001
% DNA (A.U) ^b	1.18 \pm 1.80	9.29 \pm 3.41	< 0.001
OTM (A.U) ^c	0.11 \pm 0.24	2.93 \pm 2.65	< 0.001
MN ^d	0.95 \pm 0.98	4.57 \pm 7.15	< 0.001
BN ^e	4.27 \pm 3.45	12.01 \pm 11.35	< 0.001

^a tail length; ^b % of DNA in the tail; ^c Olive tail moment; ^d micronucleated cells; ^e binucleated cells.

Figure 1
[Click here to download high resolution image](#)

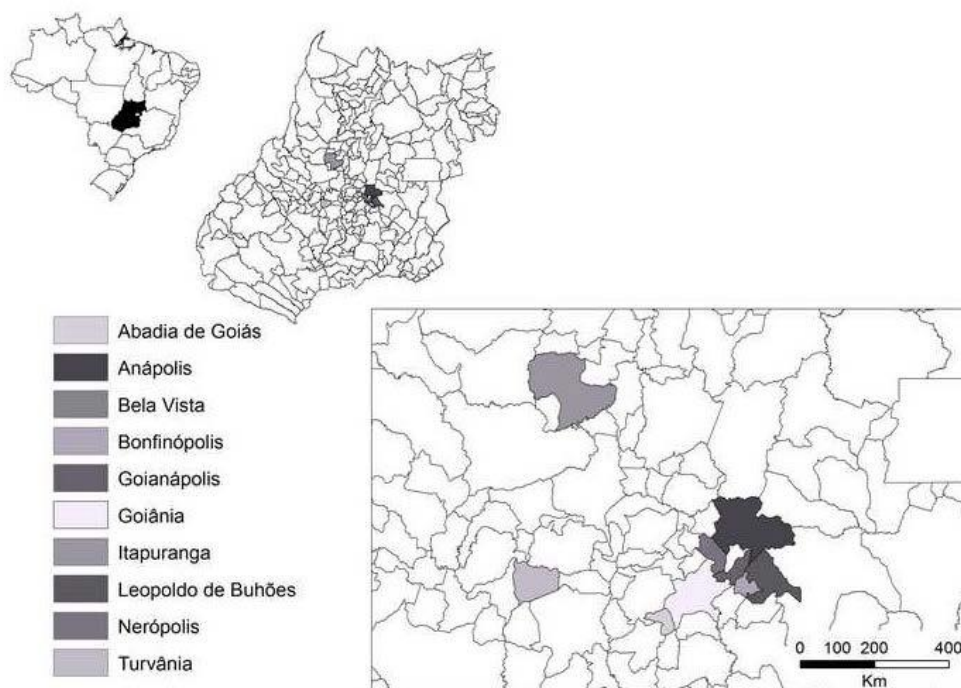


Figure 2
[Click here to download high resolution image](#)

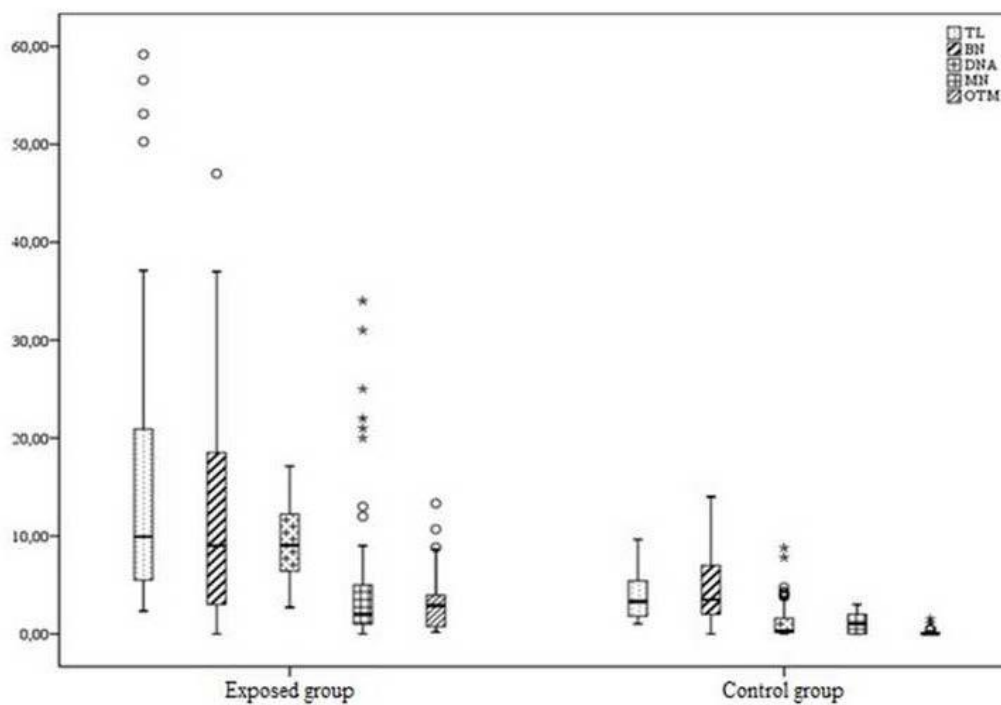


Figure captions

Figure 1. Map of the 10 Goias state municipalities

Figure 2. Box plot of the comet assay parameters in the exposed and control group