



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

**ANÁLISE MOLECULAR DOS POLIMORFISMOS DOS GENES GSTM1 E GSTT1
EM INDIVÍDUOS OCUPACIONALMENTE EXPOSTOS A AGROTOXICOS**

Goiânia, fevereiro de 2013



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

**ANÁLISE MOLECULAR DOS POLIMORFISMOS DOS GENES GSTM1 E GSTT1
EM INDIVÍDUOS OCUPACIONALMENTE EXPOSTOS A AGROTÓXICOS**

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: Fernanda Ribeiro Godoy, *B.Sc.*

Orientadora: Profa. Dra. Daniela de Melo e Silva

Goiânia, fevereiro de 2013

Dados Internacionais de Catalogação da Publicação (CIP)
(Sistema de Bibliotecas PUC Goiás)

Godoy, Fernanda Ribeiro.
G589a Análise molecular dos polimorfismos dos gene GSTT1 e
GSTM1 em indivíduos ocupacionalmente expostos a agrotóxico -
GO [manuscrito] / Fernanda Ribeiro Godoy.-- 2013.
62 f.; il.; grafs.; 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Pontifícia Universidade Católica de
Goiás, Departamento de Biologia, Goiânia, 2013.

“Orientadora: Profa. Dra. Maria do Espírito Santo Rosa
Cavalcante”.

1. Produtos químicos agrícolas. 2. Polimorfismo (Genética). 3.
Mutagênese. 4. Intoxicação. 5. Exposição ocupacional. I.Silva, Daniela
de Melo e. II. Título.

CDU 615.9(043)

ATA COMPLEMENTAR Nº 73/2012

MESTRADO EM GENÉTICA DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
DISCENTE: FERNANDA RIBEIRO GODOY
DEFENDIDA EM 15 DE FEVEREIRO DE 2013 E PRÓVA DA COM CONCEITO...A.....

BANCA EXAMINADORA

Daniela de Melo e Silva

Profª. Dra. Daniela de Melo e Silva
(presidente-orientadora)

Cláudio Carlos da Silva

Prof. Dr. Cláudio Carlos da Silva / PUC Goiás
(membro interno)

Angela Adamski da Silva Reis

Profª. Dra. Angela Adamski da Silva Reis / UFG
(membro externo)



FRANCISCO TAVELRA

AUTENTICAÇÃO

A presente cópia CONFERE com o original
apresentado. Dou Fé. 0097 FGSZTCNU-53377C-20
Goiânia, 25 de junho de 2013.

Henderson Gonçalves da Cruz
Escritor

02001303251908026083927

Consulte em <http://extrajudicial.tjgo.jus.br>

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

Para a realização do presente estudo houve a colaboração dos seguintes instituições: 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 (SES).

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus pela minha vida e de toda minha família, que na sua existência me fortalece e são responsáveis pelo que sou.

Aos meus pais, **Roberto de Godoy** e **Eliane do Carmo Ribeiro Godoy** e meu irmão **Gulherme Ribeiro Godoy**, agradeço por todo apoio, incentivo e paciência que sempre tiveram por compreenderem minha ausência em casa por todos esses anos.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás – FAPEG , pela Bolsa de Mestrado, que possibilitou a realização desse estudo e ao Professor Dr. **Aparecido Divino da Cruz, PhD**, pelo apoio profissional.

A minha Orientadora, **Profa. Dra. Daniela de Melo e Silva**, pelos seus conselhos e incentivo, boas risadas e por ter muita confiança em mim. Minha eterna gratidão em especial pelas ideias e sugestões de estudo e aprimoramento profissional, pela oportunidade que me concedeu de participar desse projeto, que contribuiu para aprofundar o meu conhecimento em genética e mutagênese.

À **Profa. Dra. Angela Adamski da Silva Reis** por todo auxílio e padronização da metodologia utilizada nesse trabalho.

Ao meu namorado, o zootecnista e mestre, **Alex da Silva Cruz** que por todos esses anos foi companheiro, conselheiro e muitas vezes meu professor, me ajudando em todos os momentos que precisei de ajuda, bastava olhar para o lado que você estava lá, meu muito obrigada.

Aos trabalhadores rurais e voluntários que tornaram esse projeto possível.

Aos Biólogos **Aldaires Vieira de Melo** e **Damiana Mirian da Cruz e Cunha** pela disposição de ir às coletas sempre que necessário sem vocês esse trabalho não teria se construído.

Às Professoras e mestres, **Emília Oliveira Alves Costa** e **Lysa Bernades Minasi** por terem sido decisivas nesse trabalho, me auxiliando em todos os momentos.

Aos membros da banca avaliadora, **Professora Dra. Angela Adamski da Silva Reis** e ao **Professor Dr. Cláudio Carlos da Silva**, Diretor do Departamento de Biologia da pontifícia universidade católica de Goiás, pela participação na banca de avaliação deste trabalho.

Aos meus amigos do núcleo de Pesquisa Replicon, Raphael Silva da Cruz, Danilo Conrado Silva, Macks, Hugo Henrique de Padua , Caroline de Melo e Andréia, meus sinceros agradecimentos.

A todos os meus professores, que me ensinaram com prazer e dedicação, compartilhando conhecimento, como sendo uma ferramenta valiosa na evolução do ser humano e, mais importante, por terem me ensinado a autonomia educativa.

A todas as pessoas que de alguma forma participaram e contribuíram para a minha conquista.

SUMÁRIO

RESUMO	XI
ABSTRACT	XII
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	XIII
LISTA DE FIGURAS	XIV
LISTA DE TABELAS	XV
LISTA DE QUADROS	XVI
1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1. AGROTÓXICOS	20
2.2. ALTERAÇÕES GENÉTICAS GERADAS PELA EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL A AGROTÓXICOS	21
2.3. INSTRUMENTOS DE INVESTIGAÇÃO TOXICOLÓGICA E BIOMARCADORES DE SUSCEPTIBILIDADE	22
2.4. POLIMORFISMOS DA SUPERFAMÍLIA DA GLUTATIONA S-TRANSFERASE (<i>GST</i>)	24
2.4.1. <i>GSTT1</i>	24
2.4.2. <i>GSTM1</i>	25
3. OBJETIVOS	27
3.1. OBJETIVO GERAL:	27
4. METODOLOGIA	28
4.1. GRUPO AMOSTRAL	28
4.2. EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS	28
4.3. ANÁLISE MOLECULAR DOS GENES <i>GST</i>	28
4.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	30
5. RESULTADOS	31
5.1. PRINCIPAIS ATIVIDADES AGRÍCOLAS DOS MUNICÍPIOS AMOSTRADOS	31
5.2. DADOS DE ESTILO DE VIDA DOS GRUPOS CASO E CONTROLE	33
5.3. ANÁLISES GENOTÍPICAS DOS GRUPOS	37
5.4. ASSOCIAÇÕES ENTRE A DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS E DADOS SÓCIO-EPIDEMIOLÓGICOS	38
6. DISCUSSÃO	40

7. CONCLUSÃO.....	45
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
ANEXO I	55
ANEXO II	58
ANEXO III	60
ANEXO IV	62
ANEXO V	63

RESUMO

O impacto do uso de agrotóxicos sobre os trabalhadores rurais é um problema que tem merecido atenção da comunidade científica em todo o mundo. A exposição ocupacional de trabalhadores agrícolas ocorre por falta de informação ou pela ausência de recursos técnicos qualificados. Esses trabalhadores estão constantemente expostos aos agrotóxicos que utilizam nas lavouras, e esta exposição pode ser responsável por danos genéticos causando um risco para a saúde. Um dos problemas da utilização de agrotóxicos é a genotoxicidade, que pode levar ao aparecimento de doenças. Pouco se sabe sobre a relação entre a genotoxicidade e a variação de polimorfismos genéticos de metabolização de xenobióticos que podem modificar a suscetibilidade individual aos efeitos genotóxicos dos agrotóxicos. Neste sentido, há a necessidade do estudo de genes como a *glutathione-S-transferase mu* (*GSTM1*) e *glutathione-S-transferase teta* (*GSTT1*) que codificam enzimas de detoxificação de compostos genotóxicos. Tais enzimas promovem a conjugação da glutathione facilitando remoção dos xenobióticos. Nesse contexto, esse estudo teve como objetivo avaliar a variabilidade polimórfica de *GSTT1* e *GSTM1* em indivíduos ocupacionalmente expostos a pesticidas, em municípios goianos com intensa atividade agrícola. Foram avaliados 235 indivíduos sendo que 120 eram trabalhadores rurais, ocupacionalmente expostos a agrotóxicos e 115 eram indivíduos não expostos a agrotóxicos, formando o grupo controle. O grupo exposto consistiu de 111 homens e apenas 9 mulheres obtendo uma média de idade 39 ± 9 anos. Estes trabalhadores rurais eram de 12 municípios goianos com intensa atividade agrícola. Verificou-se que 18% dos indivíduos expostos possuíam o genótipo *GSTT1* nulo e 49% apresentaram o genótipo *GSTM1* nulo, e que 10% apresentaram ambos os genótipos nulos. Os dados como intoxicação (41%), uso de equipamentos de proteção individual (EPI's) [52%] e se o trabalhador apenas manipulava o agrotóxico (7%), ou se apenas aplicava o agrotóxico (22%) ou se manipulava e aplicava (71%), foram todos correlacionados com os polimorfismos genéticos. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os polimorfismos dos genes *GSTM1* e *GSTT1* entre os grupos exposto e controle ($p = > 0,05$). Dessa forma, o estudo de polimorfismos genéticos como biomarcadores de suscetibilidade é de importância fundamental na compreensão dos processos de distribuição genotípica envolvidos na mutagênese e carcinogênese e poderia ajudar a minimizar os riscos para indivíduos suscetíveis que são expostos a agrotóxicos.

Palavras-chave: polimorfismos; *GSTT1*; *GSTM1*; agrotóxicos; EPI's; intoxicação.

ABSTRACT

The impact of pesticide on agricultural workers is an issue that has received attention from the scientific community worldwide. Occupational exposure of agricultural workers occurs due to lack of information or lack of skilled technical resources. These workers are exposed to pesticides in crops and this exposure may be responsible for genetic damage causing a health issue. A problem with the use of pesticides is the genotoxicity, which may lead to the onset of diseases. Little is known about the relationship between genotoxicity and genetic polymorphisms xenobiotics metabolism that can modify individual susceptibility. Therefore, there is a need to study genes as glutathione-S-transferase mu (*GSTM1*) and glutathione-S-transferase theta (*GSTT1*) encoding detoxification enzymes. These enzymes promote the conjugation of glutathione facilitating removal of xenobiotics. In this context, this study aimed to evaluate the variability of *GSTM1* and *GSTT1* polymorphisms in individuals occupationally exposed to pesticides in Goias municipalities that present intense agricultural activity. We evaluated 235 individuals which 120 were rural workers occupationally exposed to pesticides and 115 individuals were not exposed to pesticides, forming the control group. The exposed group consisted of 111 men and 9 women only getting an average of 39 ± 9 years old. These workers were from 12 rural municipalities situated at Goias state with intense agricultural activity. It was found that 18% of the exposed individuals had the *GSTT1* null genotype and 49% had the *GSTM1* null genotype, and 10% had both null genotypes. Data as intoxication (41%), use of Personal Protection Equipment (52%) and if the worker handled the pesticide (7%), or if just applied the pesticide (22%) or if the worker manipulated and applied (71%) have all been correlated with genetic polymorphisms. There were no statistically significant differences between the *GSTM1* and *GSTT1* polymorphisms between control and exposed groups. Thus, the study of genetic polymorphisms as biomarkers of susceptibility is of fundamental importance in understanding the processes involved in mutagenesis and carcinogenesis and could help minimize the risk to susceptible individuals who are exposed to pesticides.

Keywords: polymorphism, GSTT1, GSTM1, pesticides; PPE; intoxication.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

DL50: Dose letal média (50%)

FAO: *Food and Agriculture Organization of the United Nations*

OMS: Organização Mundial da Saúde

EPI'S: 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 Brasileira 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: *Ciclo Threshhold*

PCR: Reação da Cadeia em Polimerase

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

EDTA: Ácido Etilenodiamino Tetra-acético

nM: Nano Mol

uM: Unidade Molar

ng: Nano Grama

µL: Micro Litro

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

HAP: Composto aromático policíclico.

RS: Rio Grande do Sul

MT: Mato Grosso

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração das posições dos genes da classe teta de <i>GSTT1</i> no cromossomo 22, o esquema inclui a representação do alelo selvagem e mutante do gene <i>GSTT1</i> . Adaptado de Silva jr (2008).	25
Figura 2. Ilustração das posições dos genes da classe mu de <i>GST</i> , no cromossomo 1, o esquema inclui a representação do alelo selvagem e mutante do gene <i>GSTM1</i> . Adaptado de SILVA JR (2008).	26
Figura 3. Municípios goianos onde as coletas de amostras biológicas foram realizadas.	32
Figura 4. Número de trabalhadores rurais amostrado por município goiano.	33
Figura 5. Quantidade de pesticidas (número absoluto) utilizados pelos trabalhadores rurais, por município.	35
Figura 6. Curvas de dissociação dos <i>primers</i> <i>rh92600</i> , <i>gstm1</i> e <i>gstt1</i> , respectivamente, de 01 amostra do grupo exposto.	38
Figura 7. Curva de amplificação da PCR em tempo real: C_T – ciclo <i>threshold</i> . Mostra as três fases distintas da RQ-PCR: <i>baseline</i> , exponencial e <i>plateau</i>	56
Figura 8. 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 <i>SYBR® Green</i> na fita dupla de DNA da região alvo, iniciada pelo primer,(C) Aumento da fluorescência conforme o fragmento (os <i>amplicons</i>) são formados. Adaptado de Oliveira (2010).	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação dos agrotóxicos quanto as suas classes, ao seu grau de toxicidade... 21	21
Tabela 2. Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores e suas respectivas temperaturas de desnaturação (<i>melting</i>). 29	29
Tabela 3. Protocolo de termociclagem para amplificação por PCR em tempo real. 29	29
Tabela 4. Protocolo de termociclagem para a genotipagem dos primers <i>RH92600</i> , <i>GSTM1</i> e <i>GSTT1</i> 29	29
Tabela 5. Dados sócio-epidemiológicos dos trabalhadores rurais ocupacionalmente expostos aos agrotóxicos 34	34
Tabela 6. Descrição dos principais princípios ativos que os agricultores foram expostos. 35	35
Tabela 7. Relatos de intoxicação de acordo com as funções descritas pelo grupo ocupacionalmente exposto aos agrotóxicos. 36	36
Tabela 8. Características sócio-biológicas dos grupos exposto e controle..... 37	37
Tabela 9. Distribuição das frequências genótípicas dos grupos caso e controle. 38	38
Tabela 10. Distribuição dos genótipos nos grupos caso e controle, de acordo com o consumo de álcool e fumo..... 38	38
Tabela 11. Distribuição dos genótipos quanto ao tempo de exposição aos agrotóxicos, relatos de uso de EPI's e intoxicação, no grupo de trabalhadores rurais. 39	39
Tabela 12. Classificação dos grupos caso e controle, quanto à distribuição em genótipos de risco..... 39	39

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Principais atividades agrícolas desenvolvidas nos municípios.	31
---	----

1. INTRODUÇÃO

O uso de agrotóxicos, principalmente de forma indiscriminada, vem resultando em impactos negativos, tanto para o meio ambiente, como para a saúde humana, sobretudo aos consumidores de produtos agroindustriais e os produtores e trabalhadores do setor agrícola (AUGUSTO, 2012; CARNEIRO, 2012). Estimativas feitas pelas agências internacionais de saúde incluindo FAO, OMS são preocupantes e suas atenções se voltam para 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).

Em geral, a exposição ocupacional de trabalhadores agrícolas ocorre por falta de informação ou recursos técnicos qualificados. Desta forma equipamentos de proteção individual (EPI's) tendem a não ser utilizados no momento do preparo e aplicação dos agrotóxicos, sobretudo por nem sempre estarem adequados à realidade e ao clima das trabalhadores agrícolas brasileiros (PERES e MOREIRA, 2007).

Os possíveis efeitos tóxicos da exposição a agrotóxicos são conhecidos. Porém, as informações da toxicidade relacionada aos ingredientes ativos, não são suficientes para avaliar o risco dos efeitos adversos dos agrotóxicos sobre a saúde humana e ambiental (RIBEIRO *et al.*, 2009). Em relação à genotoxicidade, as alterações genéticas nos indivíduos expostos aos agrotóxicos podem ser utilizadas como marcadores de efeito biológico precoce, fornecendo um quadro geral da agressão genotóxica dos agrotóxicos (FALCK *et al.*, 1999; BOCHNER, 2007).

As principais vias de entrada dos agrotóxicos no corpo humano, em ordem crescente, são: ingestão, respiração e absorção dérmica. A penetração pela pele varia de acordo com a formulação empregada, temperatura, umidade relativa do ar, regiões do corpo (verso das mãos, pulsos, nuca, pés, axilas e virilhas absorvem mais), tempo de contato e existência de feridas (GARCIA, 2001).

No final da última década, a agricultura brasileira alcançou o primeiro lugar no ranking mundial de consumo de agrotóxicos talvez em consequência de o Brasil ser o principal produtor agrícola (BOMBARDI, 2011). Este cenário revela que a agricultura brasileira está cada vez mais dependente do uso de agrotóxico, que além de eliminar pragas, podem levar a seleção natural das pragas sobreviventes que darão origem a outras mais potentes, obrigando os agricultores a recorrerem ao uso de mais agrotóxico ou a buscar formas alternativas de controle biológico (FERNANDES *et al.*, 2012).

O uso de agrotóxico foi regularizado pela Lei Nº 7.802, de julho de 1989, regulamentada com o Decreto 4.074, de 4 de janeiro de 2002. A Lei define os agrotóxicos como: “os produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos” (MARQUES, 2010).

Mesmo com a regulamentação do uso dos agrotóxicos os níveis de intoxicação, relatados no Brasil, representam um problema de saúde pública (AUGUSTO, 2012). Atualmente, o registro dos dados de intoxicação por agrotóxicos é feito por vários sistemas, como o SINITOX, (Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas vinculado a 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, sendo 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).

Um dos problemas do uso de agrotóxicos é a genotoxicidade, que pode levar ao aparecimento de doenças, como o câncer (COSTA, 2009a). Estudos de monitoramento genético apontam que trabalhadores expostos aos agrotóxicos possuem dano genético associado a altos níveis de exposição, ao uso intensivo, principalmente, devido à falta de mecanismos de controle da exposição. A extensão do efeito genotóxico é influenciada principalmente pela duração da exposição a produtos químicos altamente reativos (RODRIGUES, 2011).

O termo "biomarcador" é utilizado para expressar uma interação entre um dado sistema biológico e um agente genotóxico (BONASSI e AU, 2002; CEBULSKA-WASILEWSKA, 2003; ANGERER *et al.*, 2007). A importância da utilização de 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).

Como exemplos de biomarcadores que podem ser utilizados na avaliação do risco de trabalhadores rurais ocupacionalmente expostos a agrotóxicos, são as grandes famílias dos genes associados ao metabolismo de xenobióticos, como as da Glutathione S-transferase

(*GST*). As substâncias tóxicas sofrem um processo de biotransformação na qual é dividido em duas fases. Na fase I, as enzimas citocromo P450, promovem a ativação de compostos químicos para seus intermediários eletrofilicos, geralmente genotóxicos. A ativação pode formar metabólitos reativos, altamente carcinogênicos, que são biotransformados pelas enzimas inativadoras da fase II, as GSTs as NATs em compostos hidrossolúveis e fáceis de serem eliminados do organismo (HATAGIMA, 2002).

O contexto descrito anteriormente, como as enzimas codificadas por esses genes realizam um importante passo na detoxificação de xenobióticos, torna-se claro que a eficiência de sua atividade pode levar a um aumento na toxicidade de um produto e na suscetibilidade individual ao desenvolvimento de tumores malignos, tais como a leucemia linfoblástica aguda em crianças, e as mielodisplasias (MDS) em adultos (BELL *et al.*, 1993). Assim, o presente estudo teve como objetivo investigar os polimorfismos dos genes *GSTM1* e *GSTT1* em trabalhadores rurais de municípios goianos expostos ocupacionalmente a agrotóxicos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Agrotóxicos

Agrotóxicos são compostos químicos especialmente desenvolvidos e produzidos para o controle de pragas na agricultura e na saúde pública. E, portanto, para facilitar modernos métodos de agricultura. São geralmente classificados pela indústria de acordo com o tipo de praga, que controlam, podendo ser fungicidas, inseticidas e herbicidas (STENERSEN, 2004).

O uso de substâncias químicas orgânicas e inorgânicas na agricultura não é uma prática atual, mas remonta à antiguidade clássica. Escritos gregos e romanos mencionavam o uso de produtos como o arsênico e o enxofre para o controle de insetos. A partir do século XVI o emprego de substâncias orgânicas extraídas de plantas foi comumente utilizado na Europa e nos Estados Unidos da América para o controle de insetos (PERES *et al.*, 2003).

No início do século XX, iniciaram-se estudos sistemáticos buscando o emprego 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 (PERES *et al.*, 2003). 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). Entretanto, a facilidade na disseminação e no uso de agrotóxicos não foi acompanhadas por programas de qualificação da força de trabalho, sobretudo nos países em desenvolvimento, expondo trabalhadores e ambientes a um conjunto de riscos desconhecidos (RIBEIRO *et al.*, 2009).

O uso indiscriminado de agrotóxicos no setor agrícola destina-se à produção de alimentos para o homem. Esta prática de manejo, é amplamente empregada para a prevenção e combate as pragas que atacam as plantas de interesse econômico, visando o aumento da produtividade. O Brasil é um dos países líderes na produção de grãos, em consequência o consumo de agrotóxicos cresce a cada ano, impulsionado pelo aumento da população humana que demanda aumento da capacidade do setor produtivo (PAUMGARTTEN, 2012).

No território nacional, o tamanho da área cultivada destinada à produção de alimento para o homem em 2011 foi de 68,1 milhões de hectares (IBGE, 2012). A produção agrícola brasileira anual também é impressionante, tendo atingido a marca de 195,6 bilhões de toneladas de produtos de origem vegetal. Pelo faturamento de alguns produtos da indústria brasileira de alimentos, na última década, pode-se avaliar a importância relativa dos produtos agrícolas no contexto do agronegócio nacional (IBGE, 2012).

Embora economicamente benéfico ao setor agrícola e ao comércio especializado, o alto consumo de agrotóxicos pode estar relacionado ao seu uso indiscriminado. É possível que o não cumprimento de medidas preventivas que visem à garantia da segurança alimentar da população e da saúde dos trabalhadores rurais combinado a outros fatores, contribuem para que resíduos dos agrotóxicos de forma negativa a saúde de consumidores, produtores e trabalhadores (RIBEIRO *et al.*, 2009).

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), os produtos químicos e ou formulações destinados ao combate de pragas no setor agropecuário nacional, que podem possuir ação herbicida, fungicida e inseticida receberão a designação agrotóxico. Portanto, são classificados de acordo com a sua toxicidade, conforme descrito na Tabela 1 (ANVISA, 2011; 2012).

Tabela 1. Classificação dos agrotóxicos quanto as suas classes, ao seu grau de toxicidade.

DL50(mg/Kg)	Classes	Grupos
50	Classe I	Extremamente Tóxico
5 a 50	Classe II	Altamente Tóxico
50 a 500	Classe III	Mediamente Tóxico
500 a 5000	Classe IV	Pouco Tóxico
5000 ou +		Muito pouco Tóxico

2.2. Alterações genéticas geradas pela exposição ocupacional a agrotóxicos

As alterações no material genético podem ser induzidas por vários fatores, dentre eles, por substâncias contidas nas formulações dos agrotóxicos. Tendo em vista a ampla utilização de agrotóxicos no controle de pragas no sistema de produção agrícola nacional e produtos alimentares, torna-se importante avaliar os possíveis efeitos mutagênicos, citotóxicos e genotóxicos dos agrotóxicos para a saúde humana (GATEVA *et al.*, 2001).

A maior parte dos mutagênicos exibe um processo de mutações, que depende de vários fatores, incluindo a natureza das alterações primárias no DNA como: modificações de base, mudanças nos resíduos de açúcar ou fosfato, quebras de cadeia, ou incorporações de bases modificadas, e os subsequentes efeitos secundários, causados pela resposta do organismo a estas modificações. Estes efeitos secundários podem incluir a ação de várias formas de reparo do material genético e a replicação de DNA sobre sequencias moldes modificadas (REIS *et al.*, 2011).

Em geral, os processos de mutagênese e carcinogênese estão, interligados, afetando a viabilidade celular e sua monitorização (DE OLIVEIRA HIRAGI *et al.*, 2011; MENDES, 2003). Define-se carcinogênese como o processo de conversão de uma célula normal em uma célula neoplásica maligna. Por outro lado os carcinógenos são os agentes que induzem o processo carcinogénico (STENERSEN, 2004). Geralmente é preciso repetidas exposições aos carcinógenos para que haja desenvolvimento de tumores malignos. A observação de que a exposição humana as substâncias presentes no ambiente pode levar ao desenvolvimento de câncer é antiga (STENERSEN, 2004). Considerando que o processo de carcinogênese é iniciado por uma alteração irreversível do DNA, que afeta a sua replicação e conseqüentemente a proliferação celular, sendo que foi demonstrado que os agrotóxicos podem promover essas alterações.

Como demonstrado em um estudo epidemiológico realizado por Olaya-Contreras *et al* (1998) com 153 casos de câncer de mama, foi observada uma associação entre o risco de desenvolvimento desse câncer e os níveis séricos dos agrotóxicos dicloro-difenil-tricloroetano (DDT). Hoshi (2009) e Dhillon *et al* (2011) comprovaram a atividade genotóxica, pelo teste do micronúcleo, de células de sangue periférico, de indivíduos expostos a agroquímicos como fungicidas, inseticidas e herbicidas. Dusman *et al* (2012), utilizando ratos e o teste do cometa, mostraram que os fungicidas bifenil, sódio fenilfenol e tiabendazol induziram danos ao DNA das células dos órgãos gastrointestinais desses roedores. Grover *et al* (2012) sugerem, a partir de um estudo realizado com leucócitos de 54 trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos, que a exposição ocupacional a estes, produtos causa danos ao DNA e o potencial mutagênico dos agrotóxicos é aumentado em tabagistas.

Em, um outro, estudo realizado por Calvalcanti, *et al.* (2002), foi demonstrado que o glifosato, um dos principais herbicidas frequentemente utilizados pelos agricultores, apresentou-se genotóxicos em eritrócitos e brânquias do peixe *Prochilodus lineatus*. Thuler *et al.* (2007) demonstraram o potencial genotóxicos de agrotóxicos utilizados nos campos de soja, indicando pelo aumento significativo de células com micronúcleos nos trabalhadores expostos.

2.3. Instrumentos de investigação toxicológica e biomarcadores de susceptibilidade

A Toxicologia Genética é a ciência que avalia os efeitos genotóxicos em potencial, que são considerados pré-requisitos importantes para o desenvolvimento de efeitos adversos a saúde como, por exemplo, desenvolvimento de cânceres. (RIBEIRO, 2003.). Grande parte das substâncias potencialmente capazes de alterar um genoma requer ativação metabólica no

organismo, antes de se tornarem efetivamente carcinogênicas. A suscetibilidade de um organismo ao câncer, portanto depende da capacidade de metabolizar e eliminar os agentes tóxicos e seus subprodutos dessas substâncias do organismo de forma eficiente (KUMAR *et al.*, 2012).

A genotoxicidade está relacionada com a capacidade de um determinado agente físico ou químico modificar a estrutura do DNA celular, causando alterações, como mutações gênicas, deleções, geradas por rearranjos cromossômicos e quebras simples e duplas (LUBIN e BOICE JR, 1997; RIBEIRO, 2003.). O monitoramento genético de populações humanas expostas a potenciais carcinógenos atua como uma estratégia preventiva para doenças genéticas (COSTA, 2009b). As alterações no genoma humano decorrentes do ambiente, estilo de vida, dieta e de atividades ocupacionais aumentam a preocupação sobre as medidas de proteção para população (BURIM *et al.*, 2004).

A associação entre propriedades genotóxicas e substâncias químicas, como os agrotóxicos, torna os testes genéticos úteis no rastreamento de agentes com potenciais oncogênicos e mutagênicos. Dessa forma, é possível caracterizar o risco de exposição e contaminação individual. Os resultados geram informações sobre os efeitos na população exposta, podendo estabelecer possibilidades de proteção ou redução desses efeitos, sendo de extrema importância para a saúde pública. Com isso, torna-se cada vez mais urgente o uso de estratégias metodológicas confiáveis, capazes de detectar e medir o dano ao DNA dos indivíduos expostos (MENDES, 2003).

Os biomarcadores de suscetibilidade são ferramentas de fundamental importância 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 à saúde humana (KUMAR *et al.*, 2011a; MENDES, 2003).

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). O polimorfismo metabólico tem sido associado de forma mais consistente ao aumento do risco de câncer. Particularmente, polimorfismo da glutathione S-transferase (*GST*), parece ter um papel importante na sustentabilidade em humanos (HIRVONEN *et al.*, 1993; ANTTILA *et al.*, 1995; ROSSINI *et al.*, 2002; ABHISHEK *et al.*, 2010; REIS, 2011; SCHNEIDER, 2011).

Os genes *GSTM1* e *GSTT1* são membros da superfamília multigênica *GST*. Eles são comumente usados como biomarcadores de suscetibilidade. Tais genes têm recebido muita atenção em decorrência da alta prevalência de deleções que resultam em genótipos nulos, causando diminuição da capacidade de desintoxicar compostos cancerígenos. Portanto, os indivíduos com este fenótipo parecem apresentar maior risco de desenvolver tumores (KUMAR *et al.*, 2011a).

2.4. Polimorfismos da superfamília da Glutathione S-transferase (*GST*)

A superfamília de enzimas *GST* compreende uma grande variedade de proteínas citosólicas, mitocondriais e microsomais que possuem tamanhos variando de 45-55 kDa. As *GST* são capazes de atuar sobre uma grande variedade de substratos, endógenos e xenobióticos. Atualmente, são descritas oito classes distintas da glutathione S-transferases: 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). Estas *GST* estão envolvidas na fase II do metabolismo e participam da desintoxicação de uma ampla gama de compostos, incluindo xenobióticos, pesticidas, carcinógenos ambientais e quimioterápicos (SINGH, SATYENDER *et al.*, 2011).

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

Os genes *GSTT1* e *GSTM1* podem ser excluídos do genoma gerando os alelos ou genótipos nulos, o alelo nulo provoca mudanças na capacidade metabólica dos indivíduos contribuindo para sua diferenciação na população (HAYES e STRANGE, 2000). Os indivíduos que possuem o genótipo nulo não tem atividade enzimática nula. Conseqüentemente, este genótipo aumenta o risco de acúmulo de toxinas nas células podendo provocar dano ao DNA, levando o aparecimento de diversas doenças (KVITKO *et al.*, 2012).

2.4.1. *GSTT1*

O gene *GSTT1* codifica uma enzima da à superfamília de proteínas *GST*. A *GSTT1* está envolvida em reações de ativação e de desintoxicação de produtos químicos industriais, tais como epoxibutano, óxido de etileno, halometano através da com glutathione. *GSTT1* é

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

Os genes *GSTT1* estão localizados em um sítio de recombinação no cromossomo 22q11.23 separados por aproximadamente 50 kb e são estruturalmente semelhantes, possuindo 5 exons, conforme na Figura 1(MATEJCIC *et al.*, 2011).

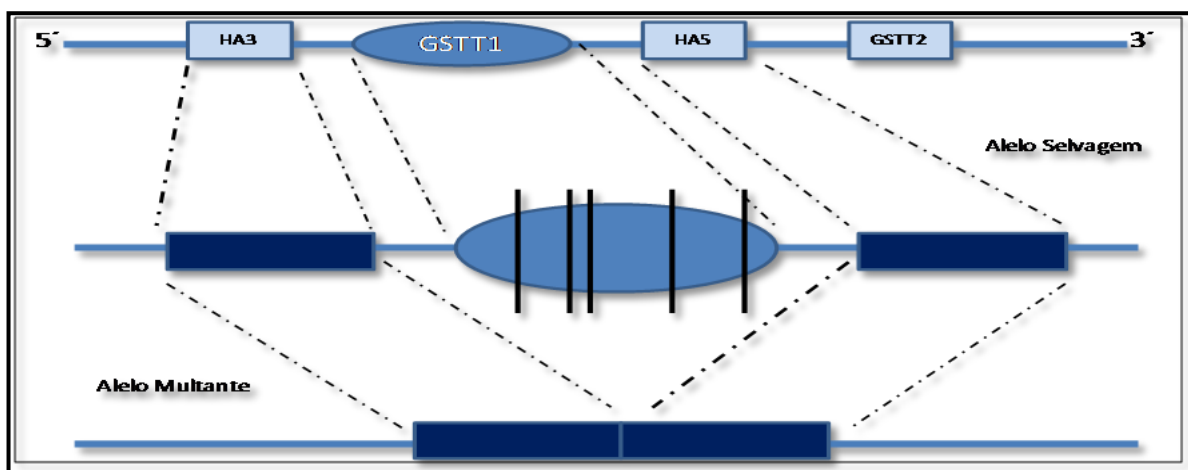


Figura 1. Ilustração das posições dos genes da classe teta de *GSTT1* no cromossomo 22, o esquema inclui a representação do alelo selvagem e mutante do gene *GSTT1*. Adaptado de Silva jr (2008).

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 glutathione-S-transferase. O genótipo nulo para o gene *GSTT1* possuem um risco maior de desenvolver leucoplasia (ROSSINI *et al.*, 2002).

2.4.2. *GSTM1*

As enzimas da classe mu de *GST*, possui 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 2], e conhecidos por serem altamente polimórficos. Estas variações genéticas podem alterar a susceptibilidade de um indivíduo a carcinogênicos e toxinas, bem como afetar a eficácia e toxicidade de certas drogas (HAYES e STRANGE, 2000).

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

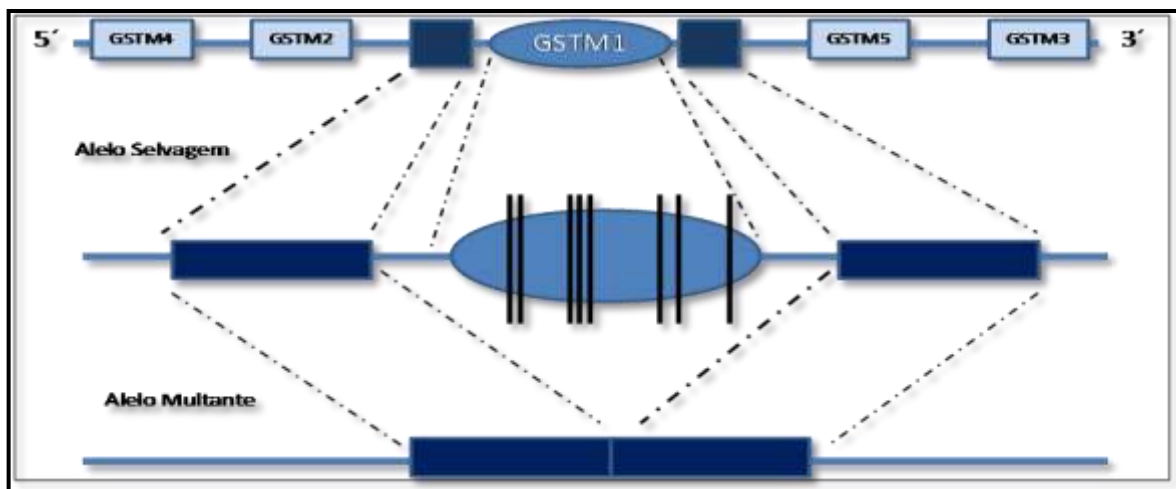


Figura 2. Ilustração das posições dos genes da classe mu de *GST*, no cromossomo 1, o esquema inclui a representação do alelo selvagem e mutante do gene *GSTM1*. Adaptado de SILVA JR (2008).

O *GSTM1* possui 8 éxons sendo o gene mais estudado dessa classe (KUMAR *et al.*, 2012), Rossini *et al.*, (2002) mostrou que na população brasileira, 42,1% possuem o genótipos nulos para *GSTM1* (ROSSINI *et al.*, 2002), confirmando os dados apresentados por outros grupos (ARRUDA *et al.*, 1998; HATAGIMA *et al.*, 2000). Sendo que as mutações nulas deste gene mu, têm sido associadas com um aumento de câncer, provavelmente devido à susceptibilidade às toxinas ambientais e cancerígenas.(DE OLIVEIRA HIRAGI *et al.*, 2011).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral:

- Avaliar a variabilidade polimórfica de *GSTT1* e *GSTM1* em indivíduos de municípios.

3.2. Objetivos específicos:

- Comparar as frequências alélicas de *GSTT1* e *GSTM1* no grupo ocupacionalmente exposto com as obtidas para o grupo controle.
- Associar os dados sócio-ambientais do grupo exposto com os polimorfismos de *GSTT1* e *GSTM1*.
- Associar o polimorfismo dos genes *GSTT1* e *GSTM1* com o uso de EPI's e os eventos de intoxicação no grupo ocupacionalmente exposto a pesticidas.

4. METODOLOGIA

4.1. Grupo Amostral

O presente estudo contempla um desenho experimental do tipo caso-controle. Foram avaliados 120 trabalhadores rurais expostos ocupacionalmente a agrotóxicos de municípios goianos. Os 12 municípios do Estado de Goiás selecionados para o estudo estão indicados na Figura 5. Além desse grupo, foram avaliados 115 indivíduos, saudáveis, também de municípios goianos, que apresentaram as mesmas condições sócio-ambientais (idade, fumo, álcool) que os trabalhadores rurais, mas que nunca sofreram exposição a pesticidas, perfazendo o grupo controle. Tais indivíduos foram escolhidos aleatoriamente e as amostras de sangue foram obtidas voluntariamente, de acordo com o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexo I). Dados como idade, hábitos sociais, tempo de exposição e tipos de agrotóxico utilizados foram anotados em um questionário de estilo de vida para a realização dos dados estatísticos (Anexo II). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, com o protocolo de número 1978/2011(Anexo III).

4.2. Extração e quantificação das amostras

As amostras biológicas foram obtidas a partir da coleta de 5,0 ml de sangue periférico dos trabalhadores rurais, sendo armazenadas em isopor com gelo e encaminhadas imediatamente ao laboratório. As coletas foram realizadas nas fazendas de cada município visitado, por um biomédico especialista em flebotomia. A extração de DNA foi realizada com o kit de extração *Ilustra Genomic Blood M S*[®] (GE, EUA), de acordo com o protocolo do fabricante. Em seguida, as amostras extraídas foram quantificadas utilizando-se o equipamento *NanoVue Plus*[™] (GE-EUA), seguindo as recomendações do fabricante. Após a quantificação as amostras de DNA foram diluídas para a concentração final de 10ng/μL de DNA. Em seguida as amostras foram armazenadas em freezer a -20°C, até o momento do uso.

4.3. Análise molecular dos genes *GST*

Fragmentsos gênicos de *GSTM1* e *GSTT1* foram detectados utilizando a reação de PCR em tempo real com a co-amplificação do gene *RH92600*, usado como controle interno da reação. Os *primers* utilizados e as condições de PCR foram previamente sugeridos por Marin

et al. (2010) e estão listados na tabela abaixo (Tabela 2). O protocolo de termociclagem pode ser visualizado na Tabela 3.

Tabela 2. Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores e suas respectivas temperaturas de desnaturação (*melting*).

Primer	Sequência	Temperatura de Desnaturação
RH92600*	F: TCATATGCAAAAACAGCTTCCC R: CTGGTCCTTCAAGCCTGTATG	75°C
GSTM1	F: GAAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC R: GTTGGGCTAAATATACGGTGG	83°C
GSTT1	F: TTCCTTACTGGTCCTCACTCTC R: TCACCGGTCATGGCCAGCA	78,5°C

* Controle Interno; F-Senso; R-Antisenso

Tabela 3. Protocolo de termociclagem para amplificação por PCR em tempo real.

*TEMP (°C)	TEMPO	ETAPA			
95	10'	Ativação enzimática			
95	10"				
60	20"	Ciclagem 35 X			
72	25"				
65	10'	Temperatura de <i>Melting</i>	0.2°C	97.2°C	162 X

*Temperatura

Para a reação de PCR foi utilizado *SYBR[®] Green PCR Master Mix* (Applied biosystems[®], EUA). O volume utilizado para cada PCR foi de 25µL contendo 0,8X do Master Mix, 1mM de Cloreto de Magnésio, 0,32 uM dos primers e 10ng/µL de DNA. (Tabela 4). Foi utilizado o termociclador iQ5 (Bio-rad[®], EUA) e para a análise das temperaturas foi utilizado o software Bio-rad[®] IQ5.

Tabela 4. Protocolo de termociclagem para a genotipagem dos primers *RH92600*, *GSTM1* E *GSTT1*.

Reagentes	[] Inicial	[] Final	Vol. 1 reação
Fast Master Mix	2X	0,8X	12,5 µL
<i>GSTT1</i> F/R	2,5uM	0,24uM	2,4 µL
<i>GSTM1</i> F/R	2,5uM	0,32uM	3,2 µL
<i>RH92600</i> F/R	2,5uM	0,4uM	4 µL
MgCl ₂	50mM	1mM	0,5 µL
DNA		10ng/µL	1 µL

[]: Concentração

4.4. Análise estatística

Os dados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais foram arquivados em um banco de dados criado no programa Excel (MICROSOFT)®, para posterior análise estatística realizada no programa Bioestat 3.0. A associação de significância foi avaliada pelos testes qui-quadrado, exato de Fisher, *odds ratio* e regressão logística múltipla. Foi utilizado um intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$). Estatísticas descritivas e comparações univariadas também foram realizadas.

5. RESULTADOS

5.1. Principais atividades agrícolas dos municípios amostrados

O Quadro 1 ilustra as principais atividades agrícolas, divididas em Lavouras Permanentes e Temporárias desenvolvidas nos 12 municípios goianos (Figura 5), que formaram o grupo caso. Esses dados foram retirados do IBGE 2012, ano base (2010).

Quadro 1. Principais atividades agrícolas desenvolvidas nos municípios.

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, 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 pimentado-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.

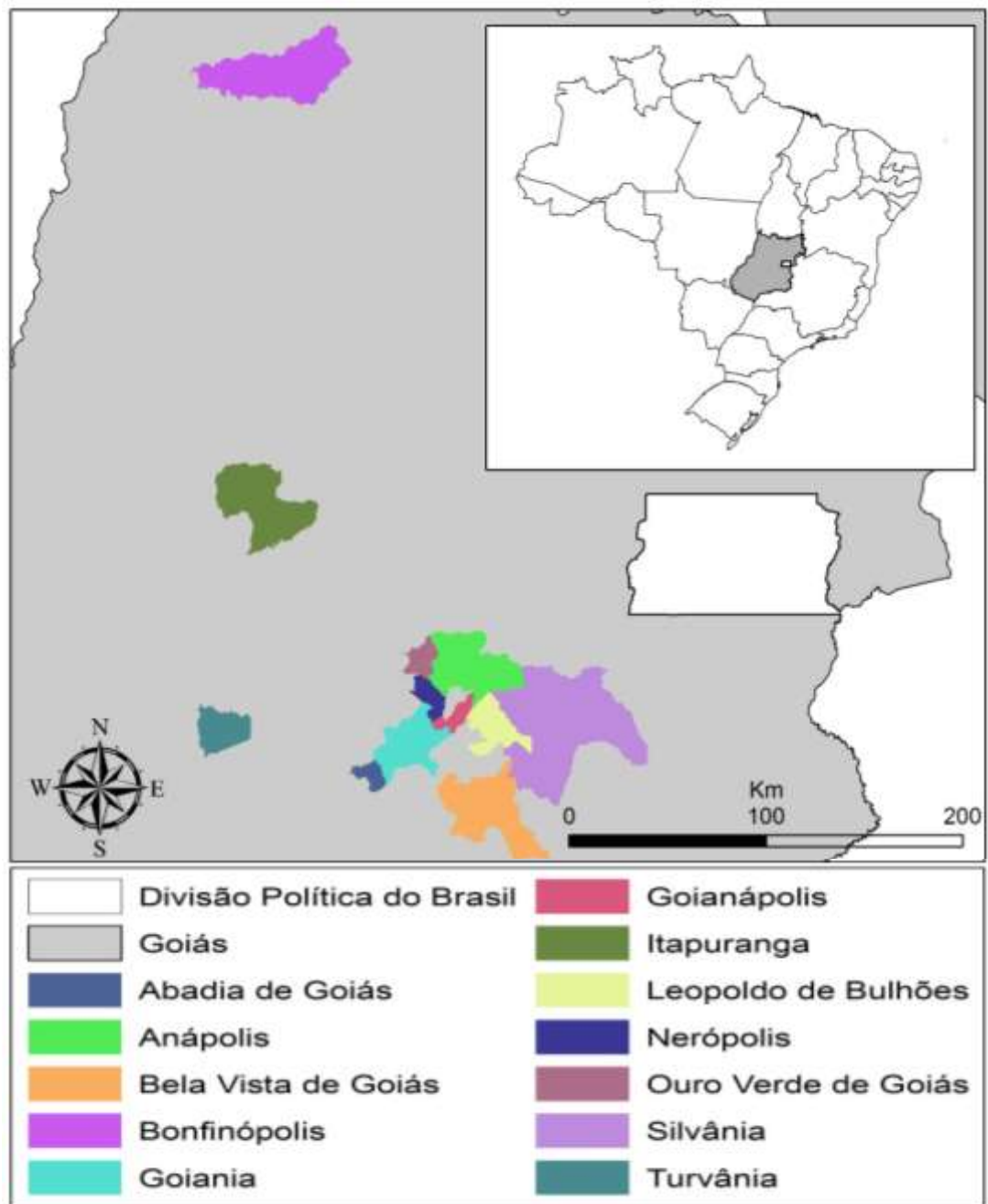


Figura 3. Municípios goianos onde as coletas de amostras biológicas foram realizadas.

A Figura 6 ilustra a distribuição dos trabalhadores rurais, amostrados por município. As cidades que apresentaram maiores adesões dos trabalhadores rurais foram Bela Vista de Goiás (21%), Itapuranga (27%) e Turvânia (19%).

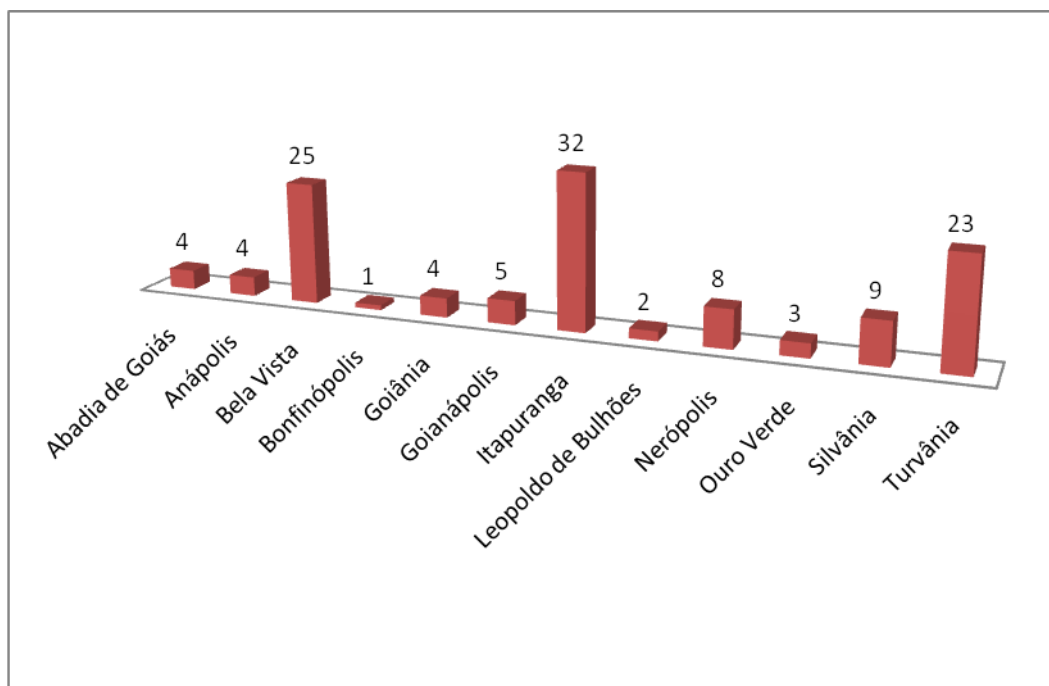


Figura 4. Número de trabalhadores rurais amostrado por município goiano.

5.2. Dados de estilo de vida dos grupos caso e controle

A tabela 5 ilustra os dados sócio-epidemiológicos dos 120 trabalhadores rurais ocupacionalmente expostos, e que tem contato com agrotóxicos, diária ou semanalmente, sendo distribuídos em 12 municípios goianos, conforme apresentado na figura 6. Dos 120 trabalhadores, 53% apresentaram idades entre 30 a 50 anos, sendo a média de idade de 39 ± 9 anos, 19% eram tabagistas e 63% etilistas. Quanto ao uso de EPI's, 62% dos trabalhadores relataram fazer uso constante de tais equipamentos, durante a aplicação e/ou manipulação dos agrotóxicos, 72% dos expostos manipulavam, ou seja, faziam o preparo e aplicavam os agrotóxicos e 42 % já se intoxicaram durante o uso de agrotóxicos, tendo relatado sintomas como dor de cabeça, náuseas, tonturas, desmaios, tremores, vertigens, salivação excessiva, convulsões, irritação e dores no corpo. O tempo de exposição dos trabalhadores rurais variou de 03 meses a 40 anos, sendo a média de contato de 13 ± 11 anos.

Tabela 5. Dados sócio-epidemiológicos dos trabalhadores rurais ocupacionalmente expostos aos agrotóxicos

Variáveis	N (%)
Idade	
<30	33 (28)
30-50	53 (44)
>50	32 (27)
Sexo	
Masculino	111 (93)
Feminino	9 (7)
Tabagismo	
Não	101 (84)
Sim	19 (16)
Etilismo	
Não	44 (37)
Sim	76 (63)
Uso de EPIs	
Sim	62(52)
Não	58(48)
Função	
Aplicar	26 (22)
Manipular	8 (7)
Ambos	86 (71)
Eventos de Intoxicação	
Sim	50 (42)
Não	70 (58)
Tempo de exposição (anos)	
> 1	5 (4)
1 a 5	23 (19)
6 a 15	38 (32)
16 a 20	26 (22)
< 21	28 (23)
Total	120 (100)

A Figura 7 demonstra o número absoluto de pesticidas usados por município, conforme informações obtidas durante a aplicação do questionário de estilo de vida.

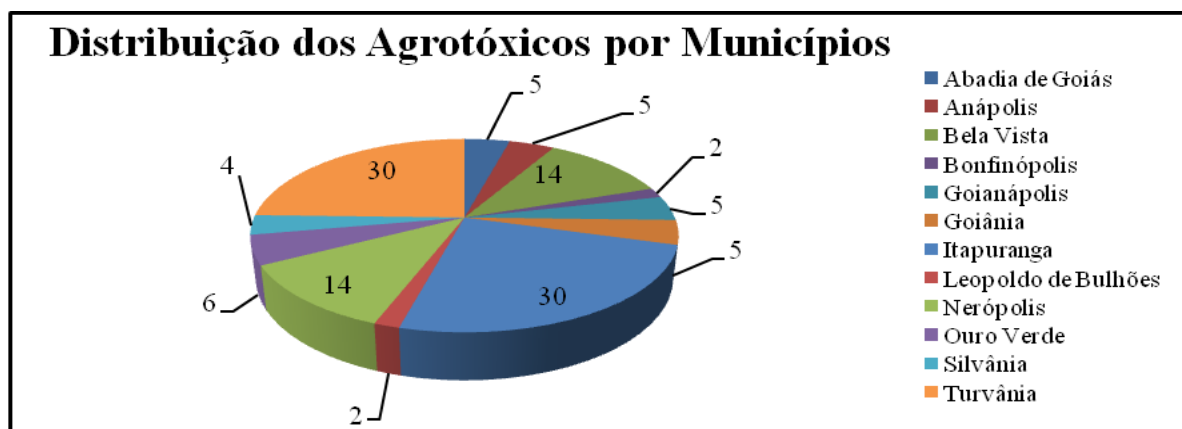


Figura 5. Quantidade de pesticidas (número absoluto) utilizados pelos trabalhadores rurais, por município.

Dos pesticidas aos quais os trabalhadores rurais foram expostos, destacam-se os seguintes princípios ativos, conforme listado na Tabela 6.

Tabela 6. Descrição dos principais princípios ativos que os agricultores foram expostos.

Princípio ativo	Tipo	Grupo Químico	Classificação toxicológica
Picloram	Herbicida	Piridinocarboxílico	Classe I
Ácido 2,4d	Herbicida	Ácido ariloxialcanoico	Classe I
Glifosfato	Herbicida	Glicina substituída	Classe IV
Clorfenapir	Inseticida	Pirazol	Classe III
Carbofurano	Inseticida	Metilcarbonato de bezofuranila	Classe I
Fenpropatrina	Inseticida	Piretroides	Classe I
Deltametrina	Inseticida	Piretroide	Classe II
Parationa metilicas	Inseticida	Organofosfato	Classe II
Lambda-cialotrina	Inseticida	Piretroide	Classe II
Cloridrato de propanocabonto	Fungicida	Carbonato	Classe II
Abamectina	Inseticida	Avermectina	Classe III
Tiofanato metílico	Fungicida	Benzimidazol	Classe IV
Trifloxistrobina	Fungicida	Extrobilurin	Classe III
Tebuconazol	Herbicida	Triazol	Classe III
Clofenapir	Inseticida	Análogo pirazol	Classe III
Azostrizol	Fungicida	Estrobilurina	Classe III
Ciproconazol	Fungicida	Trazol	Classe III
Hidróxido de cobre	Fungicida	Inorgânico	Classe III

Imidacloprido	Inseticida	Neonicotinoide	Classe IV
Classe I : Extremamente tóxico; Classe II: Altamente tóxico; Classe III: Mediamente tóxico; Classe IV: Pouco ou muito tóxico.			

Dezenove entrevistados não souberam responder qual era a base química dos produtos utilizados, restringindo-se a dizer que trabalhavam com inseticida, fungicida, herbicida ou usavam vários produtos ao mesmo tempo.

A Tabela 7 demonstra as funções exercidas pelos trabalhadores rurais (aplicar, manipular ou ambas as funções) de acordo com os eventos de intoxicação. Não houve uma diferença estatisticamente significativa entre intoxicação e as funções exercidas pelos trabalhadores rurais nos municípios goianos ($p \geq 0,05$).

Tabela 7. Relatos de intoxicação de acordo com as funções descritas pelo grupo ocupacionalmente exposto aos agrotóxicos.

Funções	Relatos de intoxicação (%)	Não há relatos de Intoxicação (%)
Manipular	3 (6 %)	5 (7 %)
Aplicar	3 (6 %)	11 (15%)
Aplicar/manipular	43 (88 %)	55 (77 %)
Total	49	71

Finalmente, ao comparar as características sócio-biológicas dos grupos caso e controle (Tabela 8), pode-se observar que não houve diferenças estatisticamente significativas entre a distribuição dos grupos quanto à idade, ao consumo de cigarro e álcool [$p > 0,05$].

Tabela 8. Características sócio-biológicas dos grupos exposto e controle.

Características	Número de Indivíduos		P
	Caso n (%)	Controle n (%)	
Idade em anos			
<30	35 (29)	23 (20)	0,9
30-50	53 (44)	45 (39)	0,07
>50	32 (27)	47 (41)	0,2
Média	39,3	38,3	
Sexo			
Masculino	111 (92)	97 (84)	
Feminino	9 (8)	18 (16)	0,08
Total	120	115	
Tabagismo			
Não	101 (84)	102 (89)	
Sim	19 (16)	15 (13)	0,6
Total	120	115	
Etilismo			
Não	44 (37)	40 (35)	
Sim	76 (63)	75 (65)	0,86
Total	120	115	

5.3. Análises genotípicas dos grupos

Para cada *primer* foi obtida uma curva de dissociação (*melting curve*), que valida os dados obtidos, com os seguintes valores de pico: 75°C para o *RH92600*, 78,5°C para o *GSTM1* e 83°C para o *GSTT1*, conforme ilustrado na Figura 7 abaixo.

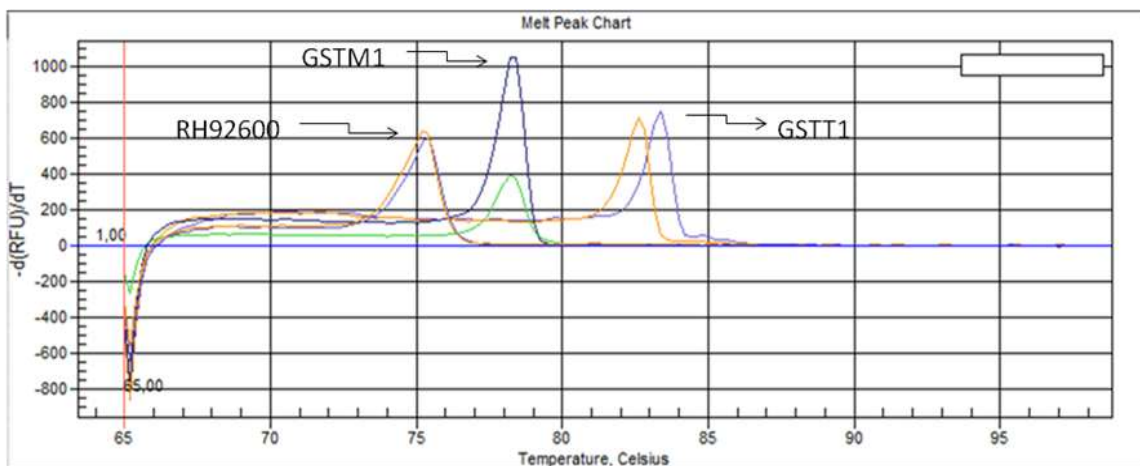


Figura 6. Curvas de dissociação dos *primers rh92600, gstm1 e gstt1*, respectivamente, de 01 amostra do grupo exposto.

As frequências dos genótipos *GSTM1* e *GSTT1* dos grupos caso e controle estão demonstradas na tabela 9, não havendo diferenças estatisticamente significativas ($p \geq 0,05$), entre a distribuição genotípica.

Tabela 9. Distribuição das frequências genotípicas dos grupos caso e controle.

	Caso	Controle	X ²	GL	P
<i>GSTT1</i>					
POSITIVO	99 (82)	93 (81)	0,1	1	0,9
NULO	21 (18)	22 (19)			
TOTAL	120 (100)	115 (100)			
<i>GSTM1</i>					
POSITIVO	61(51)	73 (63)	3,8	1	0,07
NULO	59 (49)	42 (37)			
TOTAL	120 (100)	115 (100)			

5.4. Associações entre a distribuição dos genótipos e dados sócio-epidemiológicos

A tabela 10 ilustra a distribuição dos genótipos dos trabalhadores rurais e do grupo controle, quanto aos dados sócio-epidemiológicos, como o consumo de álcool e cigarro. Como demonstrado na tabela abaixo, 18% dos casos apresentaram o genótipo *GSTT1* nulo, 49% foram classificados como *GSTM1* nulo e 10% apresentaram ambos os genótipos nulos. Além disso, não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos caso e controle, quanto à distribuição dos genotípicos e o consumo de álcool e fumo ($p \geq 0,05$).

Tabela 10. Distribuição dos genótipos nos grupos caso e controle, de acordo com o consumo de álcool e fumo.

	N				Fumante				Uso de álcool			
	Caso(%)	Controle(%)	p	X ²	Caso(%)	Controle(%)	p	X ²	Caso(%)	Controle(%)	p	X ²
<i>GSTT1</i> positivo	99(82)	93(81)			18(15)	11(10)			62(52)	60(52)		
<i>GSTT1</i> nulo	21(18)	22(19)			1(0,8)	2(1,7)			14(12)	12(10,4)		
<i>GSTM1</i> positivo	61(51)	73(63)			11(9)	8(7)			34(26)	31(27)		
<i>GSTM1</i> nulo	59(49)	42(37)			8(6,7)	5(4,3)			42(35)	38(33)		
<i>GSTT1</i> positivo e <i>GSTM1</i> nulo	47(39)	32(28)	0,4	8	8 (7)	4(3,5)	0,98	1,4	33(28)	30(26)	0,99	1,4
<i>GSTT1</i> positivo e <i>GSTM1</i> positivo	52(43)	61(53)			10(8)	7(6,1)			29(24)	23(20)		
<i>GSTT1</i> nulo e <i>GSTM1</i> positivo	9(8)	12(10)			1(0,8)	1(0,9)			5(4,2)	5(4,3)		
<i>GSTT1</i> nulo e <i>GSTM1</i> nulo	12(10)	10(9)			0(0)	1(0,9)			9(8)	7(6,0)		

A tabela 11 demonstra a distribuição dos genótipos quanto ao tempo de exposição, uso de EPI's e eventos de intoxicação, no grupo ocupacionalmente exposto. Os trabalhadores que apresentaram maiores índices de intoxicação foram os que apresentaram genótipo *GSTT1* positivo (33%), dos quais, 45% não faziam uso de EPI's e tiveram um tempo de exposição médio de aproximadamente 15 anos. No entanto, não houve associação estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre tempo de exposição, uso de EPIs e eventos de intoxicação. Embora, o não uso de EPI'S, associado aos genótipos *GSTT1* e *GSTMI* nulos, seja capaz de aumentar em 27% a chance de intoxicação, enquanto que o uso de EPI's, associado ao genótipo nulo, reduz a chance de intoxicação para 16%.

Tabela 11. Distribuição dos genótipos quanto ao tempo de exposição aos agrotóxicos, relatos de uso de EPI's e intoxicação, no grupo de trabalhadores rurais.

	Tempo de exposição (anos)	Uso de EPI's N (%)	Intoxicação N (%)
<i>GSTT1</i> positivo	15,44±12,90	54(45)	40 (33,33)
<i>GSTT1</i> nulo	16,66±10,84	9 (7,5)	11(9,16)
<i>GSTMI</i> positivo	17,5±13,61	31(25,83)	27 (22,5)
<i>GSTMI</i> nulo	13,77±11,06	32(26,66)	24(20)
<i>GSTT1</i> positivo e <i>GSTMI</i> nulo	13,19 ± 11,15	26 (21,66)	19 (15,83)
<i>GSTT1</i> positivo e <i>GSTMI</i> positivo	17,46 ± 14,08	29(24,16)	20 (16,66)
<i>GSTT1</i> nulo e <i>GSTMI</i> positivo	17,66 ± 10,72	3(2,5)	6 (5)
<i>GSTT1</i> nulo e <i>GSTMI</i> nulo	15,91 ± 10,86	6(5)	5 (4,16)

Ao se comparar as distribuições dos genótipos de risco (ausência de amplificação) e de não risco (presença da amplificação), não houve diferenças estatisticamente significativas ($p \geq 0,05$), nos dois grupos analisados (Tabela 12).

Tabela 12. Classificação dos grupos caso e controle, quanto à distribuição em genótipos de risco.

Genótipo	Caso		Controle		OR*	IC** 95%	P
	GR ¹	GNR ²	GR ¹	GNR ²			
<i>GSTMI</i>	21	99	22	93	1,1	0,6 ≤ μ ≤ 2,2	0,9
<i>GSTT1</i>	59	61	42	73	0,6	0,3 ≤ μ ≤ 1,0	0,07

¹ = GR – genótipo considerado de risco (genótipo nulo – ausência de amplificação/pico); ² = GNR – genótipo não considerado de risco (presença da amplificação). * OR= odds ratio. ** IC = Intervalo de confiança.

6. DISCUSSÃO

No presente estudo, 42% dos entrevistados relataram episódios de intoxicação, o que está 15% acima dos dados nacionais, nos quais foram registrados apenas 6% de casos de intoxicação humana, por agrotóxicos agrícolas e 22% acima dos dados registrados na Região Centro-Oeste (CO) [9%] (SINITOX, 2010). Desses casos, 7% foram registrados em Goiânia, sendo os demais em Campo Grande e Brasília. De acordo com Bochner (2007), é importante ressaltar que a totalidade dos casos registrados no país, em um dado período, pelo SINITOX, é diferente da totalidade dos casos ocorridos no país neste mesmo período, porque, além do número de centros ser insuficiente para cobrir toda a extensão territorial do Brasil, a notificação dos casos a esses centros é espontânea, sendo realizada pela própria vítima ou seus familiares, com o objetivo de obter informação sobre como proceder e onde buscar atendimento, bem como por profissionais de saúde que buscam informações sobre o tratamento a ser realizado.

Os eventos de intoxicação, dos trabalhadores rurais, ocorreram pela manipulação dos agrotóxicos, na preparação da mistura, na aplicação com bombas manuais e com tratores, dados estes que corroboram com os de Schneider (2011), no qual os sojicultores avaliados estavam envolvidos tanto na preparação da mistura dos agrotóxicos utilizados na lavoura, quanto na aplicação, a qual era realizada com tratores e bombas manuais. Bolognesi (2003) relatou que pessoas envolvidas na preparação e aplicação pela pulverização dos agrotóxicos são o grupo que mais sofre exposição devido à formação de aerossóis, que são constantemente inalados.

Os EPIs não foram utilizados por todos os trabalhadores rurais, 48% não usavam e 52% usavam, dados estes semelhantes ao de Faria *et al.* (1999), no qual, foi observado que 35% dos trabalhadores rurais da Serra Gaúcha (RS) não utilizavam nenhum tipo de EPI. O município com maior adesão aos EPIs foi o de Turvânia, representando 25% do total. No entanto, não foi detectada uma associação estatisticamente significativa entre o uso de EPIs e eventos de intoxicação.

Dos agrotóxicos que os trabalhadores rurais foram expostos, destacam-se três princípios ativos, sendo um herbicida e dois inseticidas. O princípio ativo mais usado foi o glifosato (herbicida), que é classificado como medianamente tóxico, resultados estes semelhantes aos de Caires & Castro (2002), que relataram que os agrotóxicos utilizados no Município de Alta Floresta (MT), era de maioria classificada como altamente tóxica, com destaque para os princípios ativos glifosato e ácido 2,4-diclorofenoxiacético, resultado

semelhante ao estudo.

No Estado de Goiás há uma preocupação relacionada ao uso exagerado de agrotóxicos na cultura de tomate, onde, 19,5% dos trabalhadores afirmaram trabalhar exclusivamente nesta cultura. Entretanto, o uso de agrotóxicos como organofosforados e até mesmo agrotóxicos não recomendados para a cultura de tomate podem expor os trabalhadores a riscos de intoxicação (LATORRACA *et al.*, 2008), assim como há relação entre exposição aos organofosforados e câncer de pulmão (LEE *et al.*, 2004).

Quanto à distribuição dos genótipos *GSTT1* e *GSTMI*, relacionada aos dados sócio-epidemiológicos, foi demonstrado que os indivíduos com o genótipo *GSTMI* presente foram os que mais sofreram eventos de intoxicação, devido à exposição aos agrotóxicos, embora 45% dos indivíduos desse grupo tenha relatado utilizar EPIs. No entanto, não houve associação estatisticamente significativa entre eventos de intoxicação e distribuição genotípica. Singh *et al.*, 2011 sugeriram que o genótipos *GSTMI* e *GSTT1* nulos, juntamente com lesões no DNA tem um importante papel na identificação de indivíduos com alto risco de desenvolver doenças, devido à exposição ocupacional a alguns pesticidas organofosforados. Foi observada, no grupo caso, a deleção de *GSTMI* em 49% dos indivíduos, e a deleção de *GSTT1* em 18% dos indivíduos. Para o grupo controle foi observada a deleção de *GSTMI* em 37% dos indivíduos, e para *GSTT1*, 19% dos indivíduos apresentaram a deleção. No entanto, não houve um aumento no risco de intoxicação para os genótipos nulos.

A determinação dos polimorfismos está se tornando um aspecto importante que pode aumentar a sensibilidade e a especificidade dos ensaios e de grupos sensíveis. Vários polimorfismos de enzimas que metabolizam xenobióticos têm sido identificados por afetar os resultados de biomarcadores citogenéticos, já que são capazes de ativar ou inativar compostos potencialmente genotóxicos e carcinogênicos. A ativação metabólica e inativação de agentes genotóxicos ocorrem por enzimas de metabolização de Fase I e Fase II envolvendo múltiplas interações (SINGH, S. *et al.*, 2011).

GSTs são enzimas de fase II altamente polimórficas, envolvidos na desintoxicação de vários tipos de xenobióticos (GIRI *et al.*, 2011). Indivíduos com a falta dos genes *GSTMI* e *GSTT1* estão associados com aumento do risco de desenvolver câncer devido a processos de detoxificação deficientes. Estudos anteriores indicam que indivíduos nulos são suscetíveis a alguns tipos de câncer, especialmente pulmão e da bexiga (BUTLER *et al.*, 2011; SAFARINEJAD *et al.*, 2011).

No entanto, nosso estudo demonstrou que não há diferenças significativas entre as distribuições das frequências genótípicas entre os grupos exposto a agrotóxicos e controle. Kumar *et al.*, 2011, avaliaram cerca de 115 trabalhadores de pavimentação de estradas, expostos a hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (carvão-alcatrão betume, asfalto e fumaça), e também não encontraram diferenças significativas nas distribuições genótípicas (*GSTT1* $p = 0,79$ e *GSTMI* $p = 0,95$). Tais achados também foram observados nos estudos Giri *et al.*, 2001, os quais analisaram trabalhadores expostos ao alcatrão de hulha (*GSTT1* $p = 0,78$ e *GSTMI* $p = 0,95$).

Além disso, nesse estudo, quanto aos genótipos nulos, classificados como de risco, não foi identificada associação estatisticamente significativa entre os grupos caso e controle. 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; REIS, 2011) demonstraram a importância dos polimorfismos dos genótipos *GSTT1* e *GSTMI* separadamente ou combinados, como parte do desenvolvimento de doenças. Segundo os dados de Kumar *et al.* 2012, indivíduos expostos a hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP) com genótipos *GSTMI* nulos, apresentaram risco aumentado para o desenvolvimento de tumores de laringe, pulmão, bexiga, cólon e gastrointestinal e os indivíduos com genótipo nulo de *GSTT1*, possuem um risco aumentado para o desenvolvimento de tumores cerebrais e colo retais. Estes achados indicam que os polimorfismos de *GSTMI* e *GSTT1* desempenham um papel importante na suscetibilidade humana aos agentes mutagênicos e carcinogênicos, sendo capazes de fornecer informações precoces, quanto ao risco do desenvolvimento de câncer na população, em especial, ocupacionalmente exposta a agentes ambientais.

Estudos epidemiológicos demonstram que os polimorfismos de *GSTT1* e *GSTMI* estão relacionados com o aumento da suscetibilidade de doenças, relacionadas ao stress oxidativo, tais como a infertilidade masculina (PARL, 2005; BOLT e THIER, 2006; BOHANEK *et al.*, 2009), doenças cardiovasculares (WILSON *et al.*, 2000), asma (SAADAT *et al.*, 2004; 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 evidenciou uma associação entre genótipos nulos e o risco para o desenvolvimento de catarata senil em asiáticos. Esta diferença étnica pode ser atribuída ao estilo de vida, nutrição, fatores ambientais e fatores genéticos de cada população (SIREESHA *et al.*, 2012).

No entanto, nesse estudo, a associação entre os polimorfismos dos genes *GSTT1* e *GSTM1* e o consumo de álcool e tabaco, não demonstrou significância estatística, quando comparados os grupos caso e controle, sendo que tais fatores não causaram incremento no risco de intoxicação aos agrotóxicos. Segundo Tirado Bustillos *et al.*, 2012 a frequência do genótipo *GSTT1* nulo relacionada ao consumo de álcool foi um fato de risco significativo ($OR = 2,471 / IC: 1,214 - 5,028$) para trabalhadores expostos a pesticidas, aumentando em 1,47 vezes a probabilidade de pessoas com esse genótipo apresentarem danos genotóxicos. Como já relatado o genótipo *GSTT1* nulo está envolvido na suscetibilidade ao risco de câncer e este risco está fortemente associado ao consumo de álcool e ao hábito de fumar que aumentam a carga de toxinas carcinogênicas (DUELL *et al.*, 2002).

A frequência do genótipo nulo para *GSTM1* e *GSTT1* na população da cidade do Rio de Janeiro é de 42,1 e 25,4%, respectivamente, sendo descrita por Rossine, *et al.*, 2002. Tais frequências assemelham-se às frequências encontradas nesse estudo, que foram de 49 % e 18%, respectivamente, para os genótipos nulos de *GSTM1* e de *GSTT1* nulo, no grupo exposto a agrotóxicos.

A exposição ocupacional ocorre em todos os estágios de formulação, manufatura e aplicação dos agrotóxicos. Condições ambientais como espaços fechados, altas temperaturas e umidade favorecem a exposição a agrotóxico. Os trabalhadores estão expostos aos agrotóxicos principalmente durante estágios de preparação, mistura e aplicação, mas também podem entrar em contato com os agentes durante o período de colheita. Os resíduos de pesticidas nas frutas e folhagens podem ser absorvidos principalmente na pele das mãos e antebraços. Uma vez que os trabalhadores estão frequentemente expostos a misturas complexas de agrotóxicos, é difícil atribuir o dano genotóxico a qualquer classe em particular ou composto químico. Portanto o tipo de exposição que o trabalhador rural e o tempo de exposição influenciam na análise de intoxicação pelos agrotóxicos (BOLOGNESI, 2003).

Os agricultores avaliados neste estudo estão envolvidos na preparação da mistura de agrotóxicos utilizados na lavoura, na sua aplicação, ou em ambos. Nesse estudo, a função exercida pelo trabalhador rural em relação aos eventos de intoxicação não demonstrou nenhuma relação estatística mesmo se relacionados ao genótipo, uma vez que a maioria dos trabalhadores rurais (88%) manipulava e aplicava agrotóxicos. Bolognesi, 2003 relatou que pessoas envolvidas na preparação e aplicação através da pulverização de pesticidas é o grupo que mais sofre exposição devido à formação de aerossóis em ambas as fases, que são constantemente inalados (BOLOGNESI, 2003).

Ambientes de trabalho, equipamentos de proteção individual, tempo de exposição e condições de exposição são descritos na literatura como fatores capazes de afetar os níveis de danos genéticos. Outro fator de dano é o alto número da variedade de substâncias comumente utilizadas (DA SILVA *et al.*, 2008). Em uma recente revisão, Bull *et al.* 2006 discutiu genotoxicidade em trabalhadores que aplicavam e manipulavam os agrotóxico e destacou a importância do uso de equipamentos de proteção individual. Em nosso estudo, a maioria dos trabalhadores (52%), tomou todas as medidas de proteção como o uso de EPI's nas práticas associadas à manipulação e aplicação dos agrotóxicos.

A evidência de um risco genético relacionado com a exposição resultante do uso intensivo de agrotóxicos salienta a necessidade de programas de educação para os trabalhadores agrícolas, a fim de reduzir o uso de produtos químicos na agricultura e implementar medidas de proteção. Por estas razões, o monitoramento genético deve ser considerado como parte integrante de uma boa vigilância médica em pessoas em contato direto com agrotóxicos, uma vez que permite avaliar o risco potencial de exposição ocupacional, tornando possível a implantação de medidas necessárias para a identificação precoce do risco genético.

7. CONCLUSÃO

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

- Não houve diferenças estatisticamente significativas entre as frequências dos genótipos *GSTM1* e *GSTT1*, dos grupos caso e controle;
- As frequências encontradas para a presença do gene *GSTT1*, nos grupos caso e controle, respectivamente, foram de 82% e 81%;
- As frequências encontradas para a ausência do gene *GSTM1*, nos grupos caso e controle, respectivamente, foram de 18% e 19%;
- Ao se comparar as distribuições dos genótipos de risco (ausência de amplificação) e de não risco (presença da amplificação), não houve diferenças estatisticamente significativas, nos dois grupos (caso e controle) analisados;
- A associação entre os polimorfismos dos genes *GSTT1* e *GSTM1* e o consumo de álcool e tabaco, não demonstrou significância estatística, quando comparados os grupos caso e controle, sendo que tais fatores não causaram incremento no risco de intoxicação aos agrotóxicos;
- O uso de EPIs foi relatado por 54% dos trabalhadores ocupacionalmente expostos aos agrotóxicos;
- 41% dos trabalhadores rurais relataram eventos de intoxicação, cujos principais sintomas foram: náuseas, vômitos, dores de cabeça, tonturas, irritabilidade, desmaios e convulsões. Este índice de intoxicação está bem acima da média nacional (9%), relatada pelo SINTOX e Ministério da Saúde, no ano de 2010;
- Não houve associação estatisticamente significativa entre eventos de intoxicação, uso de EPI's e função dos trabalhadores (aplicação, manipulação ou ambos).
- São necessários estudos capazes de associar o polimorfismo de genes metabolizadores de xenobióticos, como os pesticidas e exposição ocupacional, envolvendo um maior número amostral, assim como outros tipos de testes genéticos (ensaio cometa e teste do micronúcleo).

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABBAS, A.; DELVINQUIÈRE, K.; LECHEVREL, M.; LEBAILLY, P. *et al.* GSTM1, GSTT1, GSTP1 and CYP1A1 genetic polymorphisms and susceptibility to esophageal cancer in a French population: different pattern of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma. **World J Gastroenterol**, v. 10, n. 23, p. 3389-93, 2004.
2. ABHISHEK, S.; KAUR, N.; KAUR, S.; LATA, M. *et al.* Association of GSTM1 and GSTT1 gene deletions with susceptibility to DNA damage in the pesticide-exposed workers of Punjab. **Rejuvenation Research**, v. 13, n. 2-3, p. 281-284, 2010.
3. ALMEIDA, P. S. R.; SADDI, V. A. Monitoring minimal residual disease in chronic myeloid leukemia by real time PCR. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, n. 4, p. 382-386, 2007.
4. 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.
5. ANNIBALLI, F.; AURICCHIO, B.; DELIBATO, E.; ANTONACCI, M. *et al.* Multiplex real-time PCR SYBR Green for detection and typing of group III Clostridium botulinum. **Veterinary microbiology**, v. 154, n. 3, p. 332-338, 2012.
6. 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. **Cancer Research**, v. 55, n. 15, p. 3305-3309, 1995.
7. ANVISA. Agrotóxico e toxicologia. Site ANVISA, 2011. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/anvisa/home/agrotoxicotoxicologia>>. Acesso em: 10/01/13.
8. ARRUDA, V.; GRIGNOLLI, C.; GONÇALVES, M.; SOARES, M. *et al.* Prevalence of homozygosity for the deleted alleles of glutathione S-transferase mu (GSTM1) and theta (GSTT1) among distinct ethnic groups from Brazil: Relevance to environmental carcinogenesis? **Clinical genetics**, v. 54, n. 3, p. 210, 1998.
9. AUGUSTO, L. G. S. C., F F; PIGNATI, W; RIGOTTO, R M; FRIEDRICH, K; FARIA, N M X. BÚRIGO, A.C.; FREITAS, V.M.T.; GUIDUCCI FILHO, E. DOSSIÊ ABRASCO Um alerta sobre os impactos dos Agrotóxicos na Saúde Parte 2- Agrotóxicos, saúde, ambiente e sustentabilidade. **Rio de Janeiro: ABRASCO**, 2012.
10. BAHAODDINI, A.; FARRASHBANDI, H.; SAADAT, M. Genetic polymorphism of glutathione S-transferase T1 (GSTT1) and QT-interval in schizophrenia patients. **Journal of molecular neuroscience**, v. 38, n. 2, p. 173-177, 2009.
11. BOCHNER, R. Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas–SINITOX e as intoxicações humanas por agrotóxicos no Brasil. **Cien Saude Colet**, v. 12, n. 1, p. 73-89, 2007.

12. 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.
13. BOHANEK, G. P.; LOGAR, D.; TOMSIC, M.; ROZMAN, B. *et al.* Genetic polymorphisms of glutathione S-transferases and disease activity of rheumatoid arthritis. **Clinical and experimental rheumatology**, v. 27, n. 2, p. 229, 2009.
14. BOLOGNESI, C. Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 543, n. 3, p. 251-272, 2003.
15. BOLT, H.; THIER, R. Relevance of the deletion polymorphisms of the glutathione S-transferases GSTT1 and GSTM1 in pharmacology and toxicology. **Current drug metabolism**, v. 7, n. 6, p. 613, 2006.
16. BOMBARDI, L. M. intoxicação e morte por agrotóxicos no Brasil: a nova versão do capitalismo oligopolizado. **Boletim DAALUta**, 2011.
17. BONASSI, S.; AU, W. W. Biomarkers in molecular epidemiology studies for health risk prediction. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 511, n. 1, p. 73-86, 2002.
18. BUCHARD, A.; SANCHEZ, J. J.; DALHOFF, K.; MORLING, N. *et al.* Multiplex PCR Detection of GSTM1, GSTT1, and GSTP1 Gene Variants: Simultaneously Detecting GSTM1 and GSTT1 Gene Copy Number and the Allelic Status of the GSTP1 Ile105Val Genetic Variant. **The Journal of molecular diagnostics: JMD**, v. 9, n. 5, p. 612, 2007.
19. BUGANO, D.; CONFORTI-FROES, N.; YAMAGUCHI, N.; BARACAT, E. Genetic polymorphisms, the metabolism of estrogens and breast cancer: a review. **European journal of gynaecological oncology**, v. 29, n. 4, p. 313, 2008.
20. BULL, S.; FLETCHER, K.; BOOBIS, A.; BATTERSHILL, J. Evidence for genotoxicity of pesticides in pesticide applicators: a review. **Mutagenesis**, v. 21, n. 2, p. 93-103, 2006.
21. BURIM, R. V.; CANALLE, R.; MARTINELLI, A. L. C.; TAKAHASHI, C. S. Polymorphisms in glutathione S-transferases GSTM1, GSTT1 and GSTP1 and cytochromes P450 CYP2E1 and CYP1A1 and susceptibility to cirrhosis or pancreatitis in alcoholics. **Mutagenesis**, v. 19, n. 4, p. 291-298, 2004.
22. BUTLER, M. W.; HACKETT, N. R.; SALIT, J.; STRULOVICI-BAREL, Y. *et al.* Glutathione S-transferase copy number variation alters lung gene expression. **European Respiratory Journal**, v. 38, n. 1, p. 15-28, 2011.
23. CAIRES, S. M.; CASTRO, J. G. D. Levantamento dos agrotóxicos usados por produtores rurais do município de Alta Floresta-Mato Grosso. **Rev Biologia Ciências da Terra**, v. 2, n. 1, 2002.

24. CALDERÓN-SEGURA, M. E.; GÓMEZ-ARROYO, S.; VILLALOBOS-PIETRINI, R.; MARTÍNEZ-VALENZUELA, C. *et al.* Evaluation of Genotoxic and Cytotoxic Effects in Human Peripheral Blood Lymphocytes Exposed In Vitro to Neonicotinoid Insecticides News. **Journal of Toxicology**, v. 2012, 2012.
25. 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.
26. CAVALCANTI, R.; MOINO JR, A.; SOUZA, G.; ARNOSTI, A. Efeito dos produtos fitossanitários fenpropatrina, imidacloprid, iprodione e tiametoxam sobre o desenvolvimento do fungo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. **Arq. Inst. Biol**, v. 69, n. 1, p. 17-22, 2002.
27. CEBULSKA-WASILEWSKA, A. Response to challenging dose of X-rays as a predictive assay for molecular epidemiology. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 544, n. 2, p. 289-297, 2003.
28. 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.
29. COSTA, I. C. **Estudo dos Efeitos Genotóxicos do Amianto em Trabalhadores Expostos**. Dissertação de mestrado. FIOCRUZ. 2009a
30. DA SILVA, J.; MORAES, C. R.; HEUSER, V. D.; ANDRADE, V. M. *et al.* 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.
31. 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.
32. DHILLON, V. S.; THOMAS, P.; IARMARCOVAI, G.; KIRSCH-VOLDERS, M. *et al.* Genetic polymorphisms of genes involved in DNA repair and metabolism influence micronucleus frequencies in human peripheral blood lymphocytes. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 33-42, 2011.
33. DUELL, E. J.; HOLLY, E. A.; BRACCI, P. M.; LIU, M. *et al.* A population-based, case–control study of polymorphisms in carcinogen-metabolizing genes, smoking, and pancreatic adenocarcinoma risk. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 94, n. 4, p. 297-306, 2002.

34. DÜSMAN, E.; BERTI, A. P.; SOARES, L. C.; PIMENTA VICENTINI, V. E. PRINCIPAIS AGENTES MUTAGÊNICOS E CARCINOGENÔNICOS DE EXPOSIÇÃO HUMANA. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, v. 7, n. 2, 2012.
35. FADERL, S.; HOCHHAUS, A.; HUGHES, T. Monitoring of minimal residual disease in chronic myeloid leukemia. **Hematology and Oncology Clinics of North America**, v. 18, n. 3, p. 657-670, 2004.
36. FALCK, G.; HIRVONEN, A.; SCARPATO, R.; SAARIKOSKI, S. T. *et al.* Micronuclei in blood lymphocytes and genetic polymorphism for GSTM1, GSTT1 and NAT2 in pesticide-exposed greenhouse workers. **Mutation research**, v. 441, n. 2, p. 225, 1999.
37. FARIA, N. M. X.; FACCHINI, L. A.; FASSA, A. G.; TOMASI, E. Estudo transversal sobre saúde mental de agricultores da Serra Gaúcha (Brasil). **Rev Saúde Pública**, v. 33, n. 4, p. 391-400, 1999.
38. FERNANDES, V.; SILVA, L.; MESQUITA, T.; CAPETTINI, L. *et al.* Uso de pesticidas na agricultura-Análise da prática na cidade de Ibitié/MG. **Scientia Plena**, v. 8, n. 3 (a), 2012.
39. GARCIA, E. G. Segurança e saúde no trabalho rural: a questão dos agrotóxicos. 2001.
40. GATEVA, S.; VARADINOVA, E.; GEORGIEVA, V. Genotoxic Activity of the Pesticide Devrinol in Human Lymphocytes in vitro. **Comptes Rendus de l'Academie Bulgare des Sciences**, v. 54, n. 2, p. 81, 2001.
41. GINZINGER, D. G. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. **Experimental hematology**, v. 30, n. 6, p. 503-512, 2002.
42. GIRI, S. K.; ANITA, Y.; KUMAR, A.; DEV, K. *et al.* Association of GSTM1 and GSTT1 polymorphisms with DNA damage in coal-tar workers. **Science of The Total Environment**, v. 409, n. 20, p. 4465-4469, 2011.
43. GROVER, J.; YADAV, S.; VATS, V. Medicinal plants of India with anti-diabetic potential. **Journal of ethnopharmacology**, v. 81, n. 1, p. 81, 2002.
44. 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**, v. 67, n. 6, p. 2837-2839, 2001.
45. HARADA, S.; MISAWA, S.; NAKAMURA, T.; TANAKA, N. *et al.* Detection of GST1 gene deletion by the polymerase chain reaction and its possible correlation with stomach cancer in Japanese. **Human genetics**, v. 90, n. 1, p. 62-64, 1992.
46. 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**, v. 281, n. 2, p. 267-271, 2001.
47. 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**, v. 12, n. 12, p. 1509-1517, 2003.
 48. 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.
 49. HAYES, J. D.; STRANGE, R. C. Glutathione S-transferase polymorphisms and their biological consequences. **Pharmacology**, v. 61, n. 3, p. 154-166, 2000.
 50. 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**, v. 14, n. 7, p. 1479-1481, 1993.
 51. HOSHI, L. **Genotoxicidade em floricultores da região serrana do Rio de Janeiro: uso do teste de micronúcleo na mucosa oral; Genotoxicity in flower growers in the mountainous region of Rio de Janeiro: use of micronucleus test in oral mucosa.** 2009. Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca
 52. IBGE. **LEVANTAMENTO SISTEMÁTICO DA PRODUÇÃO AGRÍCOLA. ESTATÍSTICA.**, F. I. B. D. G. E. 25: 1-88 p. 2012.
 53. KELADA, S. N.; KARDIA, S. L. R.; WALKER, A. H.; WEIN, A. J. *et al.* The Glutathione S-Transferase- μ and- θ Genotypes in the Etiology of Prostate Cancer: Genotype-Environment Interactions with Smoking. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 9, n. 12, p. 1329-1334, 2000.
 54. KUBISTA, M.; ANDRADE, J. M.; BENGTSSON, M.; FOROOTAN, A. *et al.* The real-time polymerase chain reaction. **Molecular aspects of medicine**, v. 27, n. 2, p. 95-125, 2006.
 55. KUMAR, A.; YADAV, A.; GIRI, S. K.; DEV, K. *et al.* Effect of genetic polymorphism of GSTM1 and GSTT1 genotypes on cytogenetic biomarkers among coaltar workers. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 32, n. 2, p. 128-135, 2011a.
 56. KUMAR, A.; YADAV, A.; GIRI, S. K.; DEV, K. *et al.* Allelic variation of GSTM1 and GSTT1 genes in Haryana population. **Genomic Medicine, Biomarkers, and Health Sciences**, 2012.
 57. KVITKO, K.; BANDINELLI, E.; HENRIQUES, J. A. P.; HEUSER, V. D. *et al.* Susceptibility to DNA damage in workers occupationally exposed to pesticides, to tannery chemicals and to coal dust during mining. **Genetics and molecular biology**, v. 35, n. 4, p. 1060-1068, 2012.

58. LALLEMAND, F.; DESIRE, N.; ROZENBAUM, W.; NICOLAS, J. C. *et al.* Quantitative analysis of human herpesvirus 8 viral load using a real-time PCR assay. **Journal of clinical microbiology**, v. 38, n. 4, p. 1404-1408, 2000.
59. 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 effects on human health. **Comun. ciênc. saúde**, v. 19, n. 4, p. 365-374, 2008.
60. LEE, B. H.; ANNIS, P. C.; TUMAALII, F.; CHOI, W. S. Fumigant toxicity of essential oils from the Myrtaceae family and 1, 8-cineole against 3 major stored-grain insects. **Journal of Stored Products Research**, v. 40, n. 5, p. 553-564, 2004.
61. LINHARES, J. J.; DA SILVA, I. D. C. G.; NORONHA, E. C.; FERRARO, O. *et al.* 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.
62. LUBIN, J. H.; BOICE JR, J. D. Lung cancer risk from residential radon: meta-analysis of eight epidemiologic studies. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 89, n. 1, p. 49-57, 1997.
63. MACKAY, I. M. **Real-time PCR in microbiology: from diagnosis to characterization**. Caister Academic Press, 2007. ISBN 1904455182.
64. MARQUES, J. R. Meio ambiente urbano. 2010.
65. MATEJCIC, M.; LI, D. P.; PRESCOTT, N. J.; LEWIS, C. M. *et al.* Association of a deletion of GSTT2B 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. e29366, 2011.
66. MENDES, R. **Patologia do Trabalho**. São Paulo, Atheneu, 2003.
67. 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, p. S125-S132, 1998.
68. OLIVEIRA, T. M. D. S. **PCR em tempo real: métodos e aplicações**. 2010. Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro
69. OLIVEIRA, T. M. S. PCR em tempo real: métodos e aplicações. 2010.
70. PAE, C. U.; KIM, J. J.; LEE, S. J.; LEE, C. U. *et al.* Association study between glutathione S-transferase P1 polymorphism and schizophrenia in the Korean population. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 27, n. 3, p. 519-523, 2003.

71. 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.
72. PARL, F. F. Glutathione S-transferase genotypes and cancer risk. **Cancer letters**, v. 221, n. 2, p. 123, 2005.
73. 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, 2012.
74. PERES, F.; MOREIRA, J. C. Saúde e ambiente em sua relação com o consumo de agrotóxicos em um pólo agrícola do Estado do Rio de Janeiro, Brasil Health, environment, and pesticide use in a farming area in Rio de Janeiro State, Brazil. **Cad. Saúde Pública**, v. 23, n. Sup 4, p. S612-S621, 2007.
75. PERES, F.; MOREIRA, J. C.; DUBOIS, G. S.; MOREIRA, J. Agrotóxicos, saúde e ambiente: uma introdução ao tema. **Peres F, Moreira JC, organizadores. É veneno ou é remédio**, p. 23-4, 2003.
76. 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, n. 1, p. 18, 2003.
77. REIS, A. A. S. Estudo da associação do polimorfismo genético em carcinomas da tireóide. **Revista de Biologia Neotropical**, v. 7, n. 1, p. 61-62, 2011.
78. 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 [http://dx. doi. org/10.5892/rurvrv](http://dx.doi.org/10.5892/rurvrv). 2011.92. 92100. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 9, n. 2, p. 92-100, 2011.
79. RIBEIRO, L. R., Ed. **Toxicologia Genética Mutagenese Ambiental**.: SBMCTA, v.1ª edição. 2003.
80. RIBEIRO, M. L.; LOURENCETTI, C.; POLESE, L.; NAVICKIENE, S. *et al.* Pesticidas: Usos e Riscos para o Meio Ambiente. **Holos Environment**, v. 8, n. 1, p. 53-71, 2009.
81. RODRIGUES, V. R. C. B. Avaliação das alterações hematológicas, bioquímicas e genotóxicas nos trabalhadores expostos à agrotóxicos em municípios do estado do Piauí. 2011.
82. ROSSINI, A.; RAPOZO, D. C. M.; AMORIM, L. M. F.; MACEDO, J. M. B. *et al.* Frequencies of GSTM1, GSTT1, and GSTP1 polymorphisms in a Brazilian population. **Genet Mol Res**, v. 1, n. 3, p. 233-40, 2002.

83. ROUISSI, K.; OUERHANI, S.; MARRAKCHI, R.; SLAMA, M. R. B. *et al.* Combined effect of smoking and inherited polymorphisms in arylamine N-acetyltransferase 2, glutathione S-transferases M1 and T1 on bladder cancer in a Tunisian population. **Cancer genetics and cytogenetics**, v. 190, n. 2, p. 101-107, 2009.
84. 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.
85. SAADAT, M.; FARVARDIN-JAHROMI, M.; SAADAT, H. Null genotype of glutathione S-transferase M1 is associated with senile cataract susceptibility in non-smoker females. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 319, n. 4, p. 1287-1291, 2004.
86. 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.
87. SAFARINEJAD, M. R.; SAFARINEJAD, S.; SHAFIEI, N.; SAFARINEJAD, S. Association of genetic polymorphism of glutathione S-transferase (GSTM1, GSTT1, GSTP1) with bladder cancer susceptibility. **Urologic oncology**, 2011.
88. 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.
89. 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.
90. SINGH, S.; KUMAR, V.; SINGH, P.; THAKUR, S. *et al.* Genetic polymorphisms of GSTM1, GSTT1 and GSTP1 and susceptibility to DNA damage in workers occupationally exposed to organophosphate pesticides. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 725, n. 1, p. 36-42, 2011.
91. SINGH, S.; KUMAR, V.; SINGH, P.; THAKUR, S. *et al.* Genetic polymorphisms of GSTM1, GSTT1 and GSTP1 and susceptibility to DNA damage in workers occupationally exposed to organophosphate pesticides. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 725, n. 1-2, p. 36-42, 2011.
92. SINITOX. Notificações de Intoxicações no Brasil - 2010. 2010. Disponível em: < http://www.fiocruz.br/sinitox_novo/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=379 >. Acesso em: 10/01.
93. SIREESHA, R.; LAXMI, S. G.; MAMATA, M.; REDDY, P. Y. *et al.* Total activity of glutathione-S-transferase (GST) and polymorphisms of GSTM1 and GSTT1 genes conferring risk for the development of age related cataracts. **Exp Eye Res**, v. 98, p. 67-74, May 2012.

94. STENERSEN, J. **Chemical pesticides mode of action and toxicology**. CRC, 2004. ISBN 0748409106.
95. 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.
96. THULER, R. T.; DE BORTOLI, S. A.; HOFFMANN-CAMPO, C. B. Classificação de cultivares de brássicas com relação à resistência à traça-das-crucíferas e à presença de glucosinolatos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 4, p. 467-474, 2007.
97. 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.
98. VAN PELT-VERKUIL, E.; VAN BELKUM, A.; HAYS, J. P. **Principles and technical aspects of PCR amplification**. Springer, 2008. ISBN 1402062400.
99. VAN POUCKE, M.; VAN ZEVEREN, A.; PEELMAN, L. J. Letter to the editor] combined FAM-labeled TaqMan probe detection and SYBR green I melting curve analysis in multiprobe qPCR genotyping assays. **BioTechniques**, v. 52, n. 2, p. 81, 2012.
100. 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.
101. ZAFEREO, M. E.; STURGIS, E. M.; ALEEM, S.; CHAUNG, K. *et al.* Glutathione S-transferase polymorphisms and risk of second primary malignancy after index squamous cell carcinoma of the head and neck. **Cancer Prevention Research**, v. 2, n. 5, p. 432-439, 2009.

ANEXO I

PCR em tempo real

A PCR em Tempo Real foi proposta inicialmente em 1993 por Higuchi e permite fazer simultaneamente a amplificação, a detecção e a 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 da amplificação *in vitro* de DNA que são a fase de crescimento exponencial, a fase de crescimento linear e a fase estacionária (BUCHARD *et al.*, 2007; OLIVEIRA, T. M. S., 2010).

A primeira fase caracteriza-se pelo crescimento exponencial da curva de produção de amplicon e 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). O método em tempo real combina a tecnologia de amplificação por PCR com a detecção do produto em tempo real mediante o uso de corantes fluorescentes no mesmo tubo de reação (PONCHEL *et al.*, 2003; BOEHM *et al.*, 2004). Portanto a PCR em tempo real (RQ-PCR) permite a quantificação dos produtos de amplificação gênica em todas as fases de uma reação de PCR (GINZINGER, 2002). A RQ-PCR requer uma plataforma de instrumentos que contém um termociclador acoplado a um sistema ótico para a excitação e captação da fluorescência e emitida, 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 compreende ao sinal de fluorescência de fundo (*background*) emitido durante os primeiros ciclos, antes do início da amplificação dos produtos de PCR. Em seguida ocorre o ciclo C_T indicando o número de ciclos necessários para a detecção da fluorescência, que é obtida quando o C_T ultrapassa a linha do *threshold*. O *threshold* corresponde a um ponto a partir do qual a fluorescência detectada excede o limiar da fase exponencial. O *threshold* é definido automaticamente e arbitrariamente que controla a reação 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.*, 2011a). A Figura 1 abaixo ilustra o processo da RQ-PCR

A fase exponencial se dá com o aumento da quantidade de produtos formados (*amplicons*) e o sinal de fluorescência aumenta exponencialmente até atingir a fase *plateau*, que corresponde aos ciclos finais da reação. A fase de *plateau* é alcançada pela limitação dos reagentes disponíveis *in vitro*, inativação da DNA polimerase. Na fase de *plateau* há redução da eficiência da PCR (GRUBER *et al.*, 2001; PONCHEL *et al.*, 2003; BOEHM *et al.*, 2004; KUBISTA *et al.*, 2006).

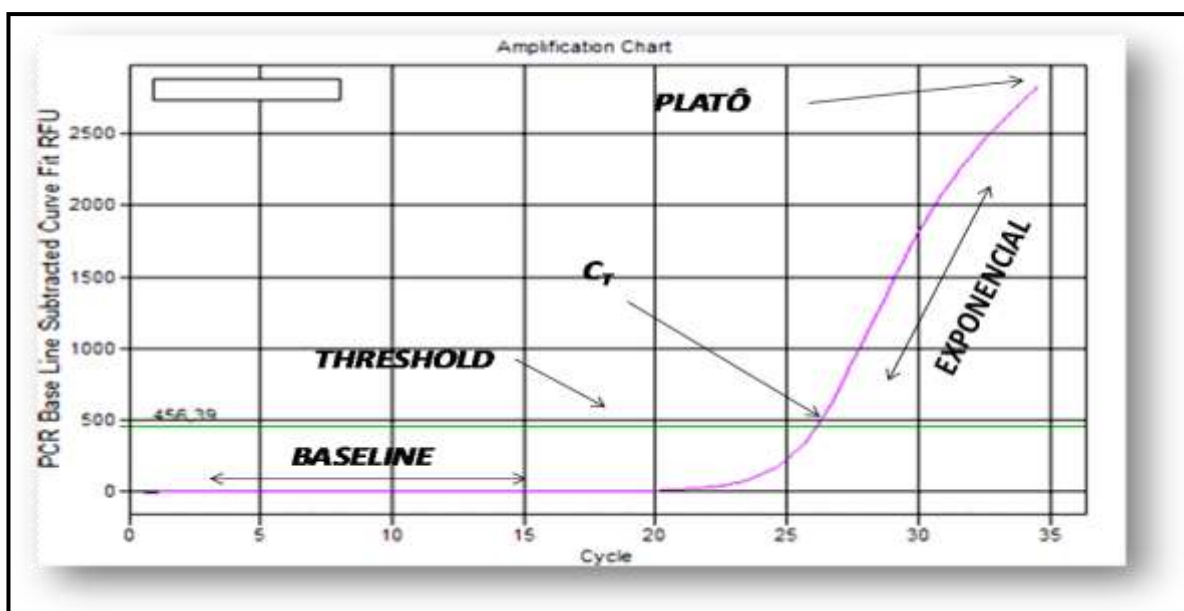


Figura 7. Curva de amplificação da PCR em tempo real: C_T – ciclo *threshold*. Mostra as três fases distintas da RQ-PCR: *baseline*, exponencial e *plateau*.

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 2) (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 (ALMEIDA e SADDI, 2007; 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).

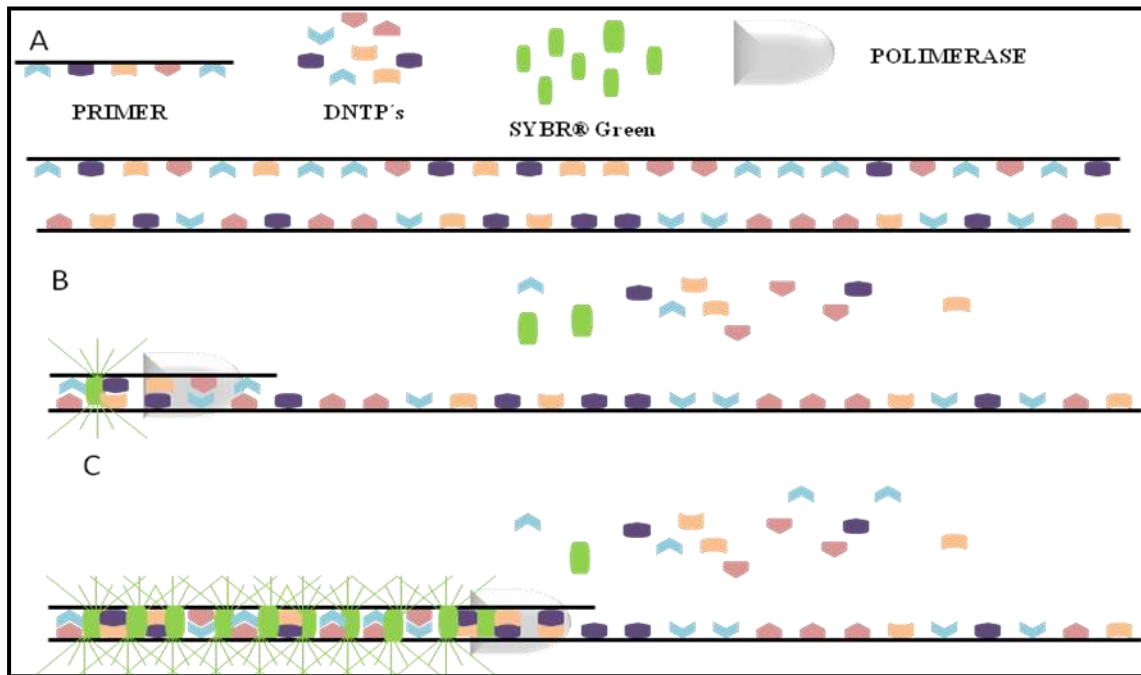


Figura 8. Figura esquemática de uma reação de RQ-PCR (A) Reagentes e uma fita de DNA desnaturada, (B) Início da reação da Taq Polimerase mostrando o intercalamento do corante *SYBR® GREEN* na fita dupla de DNA da região alvo, iniciada pelo primer, (C) Aumento da fluorescência conforme o fragmento (os *amplicons*) são formados. Adaptado de Oliveira (2010).



ANEXO II



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: Carolinne Borges Khayat 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 Fernanda Ribeiro Godoy e Daniela de Melo e Silva, e com eles poderei manter contato pelos telefones: (62) 23592518 (Fernanda) 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



ANEXO III



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

Questionário

- 1) Nome: _____
- 2) Sexo: F M
- 3) Idade:
- 4) Fumante: Sim Não Em caso afirmativo, fuma por quanto tempo e quantos cigarros por dia?
- 5) Uso de bebida alcoólica? Sim Não. Em caso afirmativo, qual tipo de bebida e qual frequência?
- 6) Problemas de saúde: Sim Não
- 7) Qual (is) e quando manifestou:
- 8) Estado 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 Tonturas
 Queimaduras e alterações da pele Desmaios
 Irritação de nariz, garganta e olhos, provocando tosse e lágrimas
 Falas com frases desconexas Tremores no corpo
 Irritação ou Nervosismo Indisposição, fraqueza e mal estar
 Vertigem e alterações na visão Salivação e sudorese aumentadas
 Convulsões Dores no corpo, principalmente braços, pernas e peito
 Outros. Especificar:

Pesquisadora Responsável: Daniela de Melo e Silva – 99549691

ANEXO IV



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) 3346-1070 • Fax: (62) 3346-1070
www.pucgoias.edu.br • prope@pucgoias.edu.br

Registro CEP 1978/2011

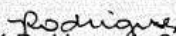
DECLARAÇÃO

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


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

Goiânia, 29 de Fevereiro de 2012.

ANEXO V

(OLAYA-CONTRERAS *et al.*, 1998)

(HOSHI, 2009; DHILLON *et al.*, 2011)

(DÜSMAN *et al.*, 2012)

(GROVER *et al.*, 2002)

(CAVALCANTI *et al.*, 2002)

(THULER *et al.*, 2007)

MESTRADO EM GENÉTICA DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
DISCENTE: FERNANDA RIBEIRO GODOY

DEFESA DE TÍTULO DE FEVEREIRO DE 2013 E PROVA JA COM CONCEITO... A

(BOLOGNESI, 2003)

(CAIRES e CASTRO, 2002)

(FARIA *et al.*, 1999)

(SINGH, S. *et al.*, 2011)

(KUMAR *et al.*, 2011b)

(GIRI *et al.*, 2011)

(KUMAR *et al.*, 2012)

(SUN *et al.*, 2010)

(CAIRES e CASTRO, 2002)

(ROSSINI *et al.*, 2002)

(BULL *et al.*, 2006)

(OLIVEIRA, T. M. D. S., 2010)

(SILVA JÚNIOR, 2008)

(SILVA JÚNIOR, 2008)

BANCA EXAMINADORA

Daniela de Melo e Silva

Prof. Dra. Daniela de Melo e Silva
(presidente-orientadora)

Cláudio Carlos da Silva

Prof. Dr. Cláudio Carlos da Silva / PUC Goiás
(membro interno)

Angela Adamski da Silva Reis

Prof. Dra. Angela Adamski da Silva Reis / UFG
(membro externo)

FRANCISCO TAVEIRA
AUTENTICAÇÃO
A presente cópia CONFERE com o original apresentado. Dou Fé. 0097-465276CNU-53377C-3D
Goiânia, 25 de junho de 2013.
Mendonça Gonçalves da Cruz
Escrivente
02001303251908026083927
Consulte em <http://extrajudicial.tjgo.jus.br>