

Listas de conteúdo disponíveis no [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

Toxicologia e Farmacologia Ambiental

página inicial da revista www.elsevier.com/locate/etap

Anormalidades cromossômicas e expressão desregulada de genes de reparo de DNA

em agricultores expostos a pesticidas

Marília Braga Costa ^{a,b,1}, Isabelle Rocha Farias ^{a,b,1}, Cristiane da Silva Monte ^{a,b}, Luiz Ivando Pires Ferreira Filho ^{a,b}, Daniela de Paula Borges ^{a,b},
Roberta Taiane Germano de Oliveira ^{a,b}, Howard Lopes Ribeiro-Junior ^{b,d,e},
Sílvia Maria Meira Mes ^{b,c}, Ronald Feitosa Pinheiro ^{b,c,d,e,*}

^a Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil^b Laboratório de Citogenética do Câncer, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil^c Departamento de Medicina Clínica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil^d Programa de Pós-Graduação em Medicina Translacional, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil^e Programa de Pós-Graduação em Patologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil

ARTICLE INFO

Palavras-chave:

Expressão de mRNA
dos genes de reparo
do DNA
Anormalidades cromossômicas
Agricultores
Pesticidas
Biomarcadores

ABSTRACT

A exposição a pesticidas é considerada um dos principais fatores subjacentes ao aumento do risco de distúrbios hematológicos em trabalhadores agrícolas devido ao seu potencial carcinogênico. No entanto, o impacto genotóxico dos pesticidas na integridade do DNA das células-tronco da medula óssea (BMSC) de agricultores expostos ainda não é bem conhecido. Avaliamos a presença de anormalidades cromossômicas (CA) e a expressão de mRNA de alvos de reparo de DNA (*ATM*, *BRCA1*, *BRCA2*, *RAD51*, *XRCC5*, *XRCC6*, *LIG4*, *CSA*, *CSB*, *XPA*, *XPC*, *XPG*) em 90 amostras de medula óssea de agricultores divididos em três grupos: agricultura comercial (CF), agricultura familiar (FF) e agricultura orgânica (OF). Nossos resultados mostraram que os agricultores dos grupos CF (72,7%) e FF (27,3%) apresentaram valores significativamente mais altos de CA em comparação com o grupo OF (0,0%; $p = 0,003$). O grupo CF apresentou menores valores de *XPG* ($p = 0,008$), *CSA* ($p < 0,001$), *ATM* ($p = 0,036$) e *LIG4* ($p = 0,004$) de mRNA do que OF. Os FF apresentaram menor expressão de *XPG* ($p = 0,012$) e *LIG4* ($p = 0,004$) do que os OF. CF+ FF indivíduos com ≥ 12 anos de exposição a pesticidas apresentaram menor expressão de mRNA de *XPC* ($p = 0,001$), *XPG* ($p = 0,010$), *CSB* ($p = 0,05$), *ATM* ($p = 0,030$) e *LIG4* ($p = 0,044$) do que aqueles que foram expostos por < 12 anos. O grupo CF+ FF com AC apresentou uma expressão menor de *BRCA2* em comparação com o grupo CF+ FF sem AC ($p = 0,007$). Esses resultados destacam que a exposição genotóxica a pesticidas afeta negativamente o perfil de expressão de importantes genes de reparo de DNA em BMSC, favorecendo lesões cromossômicas irreparáveis.

1. Introdução

A produção agrícola constitui a principal base da economia brasileira e o mercado de pesticidas experimentou uma rápida expansão na última década (190%), colocando o Brasil no topo do ranking mundial desde 2008 (Rigotto et al., 2014). O Brasil já é classificado como um dos principais produtores de soja e o primeiro consumidor de pesticidas. As áreas agrícolas com maior destaque no país estão localizadas regiões Sul, Centro-Oeste e Nordeste. No Ceará, a região do Baixo Jaguaribe é uma das maiores áreas agrícolas do semiárido, com intenso uso de agrotóxicos em fruticultura. A contaminação nessas áreas ocorre por contato direto, pelo ar, água, pulverização de pesticidas e

descarte incorreto de resíduos de pesticidas (Rigotto et al., 2013; Gama et al., 2017).

Os pesticidas foram classificados como carcinógenos humanos conhecidos (Grupo 1A) e prováveis (Grupo 2A) pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC, 2014) e foram associados a alterações cromossômicas, estresse oxidativo, condições neurodegenerativas, doenças cardiovasculares e distúrbios reprodutivos (Cocco et al., 2013; Nicolopoulou-Stamati et al., 2016; Polito et al., 2016). As lesões genéticas são eventos importantes no desenvolvimento da carcinogênese e o reparo de DNA propenso a erros é considerado um fator de risco para vários tipos de câncer (Weeden e Asselin-Labat, 2018; Iyama e Wilson, 2013; Pawlyn e Morgan, 2017). Os danos ao DNA podem resultar da exposição genotóxica ambiental,

* Autor correspondente em: Rua Pereira Valente, 738, Meireles, 60160250, Fortaleza, Ceará, Brasil.

Endereços eletrônicos: ronaldpinheiro@pq.cnpq.br, ronaldpinheiro@uol.com.br (R.F. Pinheiro).

¹ Créditos iguais.

espécies reativas de oxigênio, irradiação UV e alterações químicas que podem ocorrer na fita simples ou na fita dupla do DNA, criando assim instabilidade genômica que pode resultar em apoptose, senescência e/ou desenvolvimento de carcinogênese (Hoeijmakers, 2009; Weeden e Asselin-Labat, 2018).

As quebras de DNA são reparadas por meio de reparo de quebra de fita simples (SSBR) ou reparo de quebra de fita dupla (DSBR). Para a quebra de fita simples, o mecanismo mais significativo baseia-se no reparo por excisão nuclear (NER), que tem duas vias: reparo global do genoma (GGR), sondando o genoma em busca de distorções de fita; e o reparo acoplado à transcrição (TCR), que remove lesões distorcidas que bloqueiam as polimerases de RNA de alongamento (Alekseev e Coin, 2015; Budden e Bowden, 2013; Scharer, 2013). Os principais participantes da via de reparo NER incluem proteínas que compõem o grupo de complementação do Xeroderma pigmentosum, especialmente as proteínas XPA, XPC, XPD e XPG (Alekseev e Coin, 2015; Martijn et al., 2014; Weeden e Asselin-Labat, 2018) e as proteínas da síndrome de Cockayne, especialmente CSA e CSB (Melis et al., 2013; Petruseva et al., 2014; Saijo, 2013). A proteína XPC é considerada a sinalização celular do GGR, enquanto a CSA e a CSB são consideradas a sinalização celular do TCR. Para ambos os ramos de NER, as proteínas XPA, XPF e XPG são relacionadas como os verdadeiros efetores (Weeden e Asselin-Labat, 2018; Scharer, 2013).

As lesões de quebra de fita dupla (DSBs) do DNA são consideradas o tipo mais grave de dano ao DNA em células-tronco hematopoéticas (HSC) que, se não forem reparadas adequadamente, podem contribuir para o desenvolvimento de anormalidades cromossômicas e transformação neoplásica (Weeden e Asselin-Labat, 2018; Iyama e Wilson, 2013). Existem dois mecanismos principais conhecidos para o reparo de DSBs: junção de extremidades não homólogas (NHEJ) e recombinação homóloga (HR). O primeiro (NHEJ) une as extremidades das fitas de DNA e está associado a um risco elevado de mutagênese, enquanto a recombinação homóloga (HR) usa a cópia intacta na cromátide irmã para alinhar e selar adequadamente as extremidades quebradas de maneira livre de erros (Weeden e Asselin-Labat, 2018; Iyama e Wilson, 2013). O mecanismo de reparo NHEJ depende do heterodímero Ku70/ku80 (*XRCC6/XRCC5*) que se liga às extremidades do DNA e à DNA ligase IV por participar dos danos. Com relação à HR, a ATM sinaliza para BRCA1/BRCA2, membros da família BRCA, para interagir com o complexo RAD (principalmente *RAD51*). Ambos os sistemas envolvem muitas proteínas diferentes, e os processos são muito mais complicados do que simplesmente relatado aqui (Weeden e Asselin-Labat, 2018).

Os trabalhadores agrícolas representam uma população única com exposição substancial a vários possíveis carcinógenos, inclusive pesticidas. Indivíduos empregados na agricultura apresentam perfis distintos de risco elevado de câncer, especialmente para cânceres hematopoiéticos da medula óssea (Gunier et al., 2017) (Síndrome Mielodisplásica (SMD), Leucemia Mieloide Aguda (LMA) e Mieloma Múltiplo), o que nos levou anteriormente a estudar alterações de genes de reparo de DNA na medula óssea de trabalhadores agrícolas. Nosso grupo demonstrou anteriormente que a expressão de mRNA e os polimorfismos funcionais de genes como *ATM*, *LIG4*, *BRCA2*, *BRCA1*, *XPA*, *XPC*, *XPD* foram associados à síndrome mielodisplásica e à leucemia mieloide aguda (Ribeiro et al., 2015, 2017a, b; Santiago et al., 2017). A exposição a pesticidas tem sido associada a estresse oxidativo, anormalidades cromossômicas, distúrbios de sinalização celular e mutações genéticas (Chen et al., 2010; Hernáíndez e Menéndez, 2016), mas, até onde , não há nenhum relatório que avalie a expressão de genes relacionados ao sistema de reparo do DNA. Assim, o objetivo deste relatório é avaliar a presença de anormalidades cromossômicas e alterações na expressão de mRNA de genes de reparo do DNA em amostras de medula óssea de uma população agrícola bem definida exposta a pesticidas como possíveis novos moduladores da exposição a danos ao DNA.

2. Materiais e métodos

2.1. Sujeitos do estudo

Os grupos expostos a pesticidas consistiam em 90 agricultores divididos em

três grupos: a) agricultura comercial (CF); b) agricultura familiar (FF); e c) agricultura orgânica (OF) (USDA, 2015). O grupo CF é formado por trabalhadores que produzem em larga escala e são expostos diariamente (no mínimo 6 h/dia) a uma alta concentração de pesticidas com uso mínimo de dispositivos de proteção (apenas 10% usam proteção completa de Equipamento de Proteção Individual (EPI)). O grupo FF consiste em indivíduos que cultivam para subsistência, onde o excedente de sua produção é vendido para os mercados locais ou regionais. Esse grupo lida com os produtos químicos de pesticidas de classe toxicológica mais alta e não usa nenhum dispositivo de proteção. O grupo OF é formado por agricultores que não usam pesticidas há pelo menos dez anos e seguem o desenvolvimento de diretrizes de agricultura sustentável. Usamos esse grupo como controle na tentativa de selecionar indivíduos da mesma área geográfica com um estilo de vida diferente, recrutados no mesmo período.

Os critérios de inclusão foram previamente definidos por um estudo epidemiológico (Rigotto, 2011) realizado no município de Limoeiro do Norte (nordeste brasileiro) (Fig. 1), uma região onde os indivíduos viviam e trabalhavam como agricultores por pelo menos dez anos, expostos ou não a pesticidas. Este estudo foi aprovado pelo Comitê Nacional de Ética e Pesquisa (CONEP) e o consentimento informado por escrito foi obtido de cada participante (N° 016.02.11).

2.2. Parâmetros demográficos e clínicos

Todos os indivíduos responderam a um questionário face a face, que incluía informações demográficas e hábitos de vida diária, como idade e sexo, consumo de álcool, hábito de fumar, histórico familiar de câncer, uso de equipamentos de proteção individual (EPIs), tempo de trabalho na agricultura e tipo de agrotóxicos mais utilizados. Foram considerados fumantes aqueles que consumiam um ou mais cigarros por dia, enquanto os etilistas eram aqueles que consumiam pelo menos um tipo de bebida alcoólica (Pires, 2010). Com relação ao tempo de trabalho, os agricultores expostos a pesticidas foram dicotomizados entre aqueles que trabalham há menos de doze anos e aqueles com mais de doze anos de trabalho (Araújo et al., 2007). A aplicação de questionários e a coleta de amostras de medula óssea foram realizadas em 2017 e 2018.

2.3. Aspiração e processamento da medula óssea

A medula óssea de todos os agricultores foi obtida por aspiração por um hematologista experiente no mesmo dia em que os questionários foram aplicados e processados no Laboratório de Citogenômica do Câncer (Universidade Federal do Ceará) para análise citogenética e de expressão gênica.

2.4. Perfil de danos ao DNA por análise de cariótipo convencional

As células da medula óssea foram cultivadas para análise cromossômica por cariótipo convencional de banda G. Em resumo, as culturas foram estabelecidas em meio RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, NY, EUA) contendo 30% de soro fetal de bezerro. Após 24 horas de cultura de células, a colcemida foi adicionada para bloquear o fusível mitótico (concentração final de 0,05 µg/mL). Após o processo de incubação, as células foram expostas a uma solução hipotônica (KCl 0,068 mol/L) e fixadas com o tampão de Carnoy (metanol/ácido acético, proporção de 1:3). As lâminas foram preparadas e coradas com KaryoMAX® Giemsa Stain. Sempre que possível, foi analisado um mínimo de 20 metáfases de cada caso e os cromossomos foram analisados com o CytoVion Automated Karyotyping System (Applied Imaging, San Jose, CA, EUA). O número de metáfases analisadas para cada caso (amostras de medula óssea, não de sangue periférico) seguiu a recomendação do ISCN 2016. O ISCN é um sistema internacional para citogenômica humana que estabelece regras básicas para trabalhar e descrever qualquer rearranjo genômico identificado por técnicas que variam de cariotipagem a FISH, microarranjo e sequenciamento de DNA (McGowan et al., 2016).

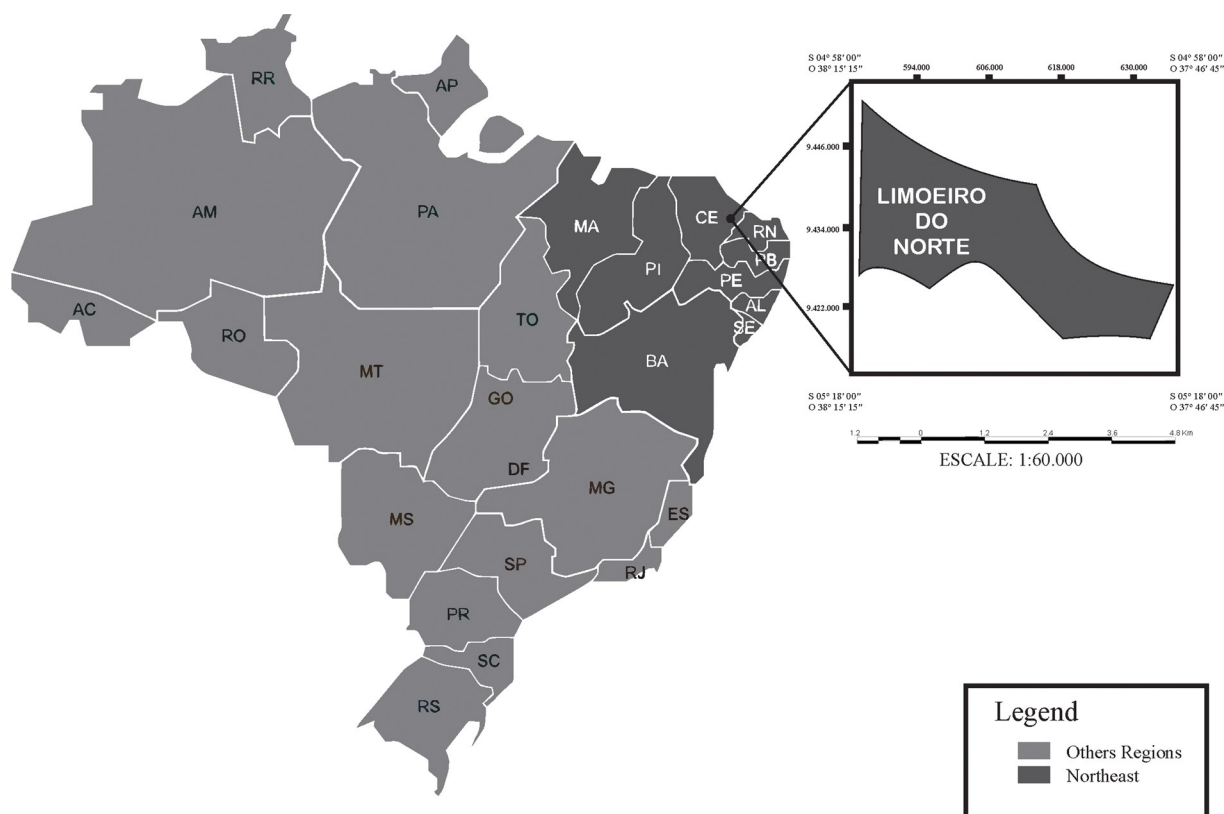


Fig. 1. Localização do município de Limoeiro do Norte, na Região Nordeste (Brasil).
Fonte: INPE (Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais).

2.5. Análise de expressão de mRNA

2.5.1. Extração de RNA total e síntese de cDNA

As extrações de RNA total de células mononucleares isoladas foram realizadas com TRizol Reagent™ (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), e a síntese de cDNA foi gerada a partir do RNA total com o High Capacity cDNA Reverse Transcription kit® (Applied Biosystems, San Jose, CA, EUA), de acordo com o protocolo do fabricante. As amostras de cDNA foram armazenadas a -20° C até o uso posterior.

2.5.2. PCR quantitativo em tempo real

As reações de PCR quantitativo em tempo real (qPCR) foram baseadas em ensaios TaqMan (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA) e executadas em um 7500 Fast System® (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA). Inventariado. O sistema de expressão gênica Taq- Man (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA) foi empregado para a expressão gênica quantitativa dos genes de reparo de DNA selecionados: a) Classe de fita simples: *XPG* (Hs01557031_m1), *ERCC6* (Hs00972920_m1), *ERCC8* (Hs01122124_m1), *XPA* (Hs00166045_m1) e *XPC* (Hs01104213_m1); b) Classe de fita dupla: *ATM* (Hs01112344_m1), *BRCA1* (Hs01556191_m1), *BRCA2* (Hs01037423_m1), *RAD51* (Hs00947967_m1), *XRCC5-ku80* (Hs00897854_m1), *XRCC6-ku70* (Hs00750856_s1) e *LIG4* (Hs00934061_m1). Para validar a estabilidade do nível de expressão dos genes candidatos para controles endógenos, usamos o software *Best keeper*. Com base nisso, o nível de expressão da hipoxantina fosforibosiltransferase 1 (*HPRT1*) e da ubiquitina (*UBC*) foi escolhido para normalizar as diferenças no cDNA de entrada. Cada amostra foi realizada em duplicata e as proporções de expressão foram calculadas usando o método $2^{-\Delta Cq}$ (Schmittgen e Livak, 2008).

2.6. Análise estatística

Dados sobre a expressão relativa de mRNA (valores ΔCq - ciclo quantitativo)

foram expressos como média e intervalo (máximo e mínimo) a fim determinar a possível associação entre as expressões gênicas relativas e as variáveis analisadas. A normalidade foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk e os outliers foram removidos da análise final. O teste *t* de Student ou a ANOVA unidirecional com o teste *Post-Hoc* de Tukey ou Games Howell foram empregados para analisar as associações entre a expressão gênica e as variáveis de resultados. A homogeneidade das variâncias de todas as variáveis foi testada pelo teste de Levene. Como os genes funcionam em uma cascata de eventos, avaliamos suas correlações usando o teste de correlação de Pearson para obter os valores de *r* e *r*². A magnitude do coeficiente de correlação de Pearson foi usada para medir a força das correlações da seguinte forma: 0,1 <|
 < 0,3= correlação pequena; 0,4 <|*r* |<0,6= correlação média/moderada e |*r* |> 0,7= grande/forte (Mukaka, 2012).

O teste do qui-quadrado foi usado para comparar as frequências entre os grupos. Como a expressão gênica é uma variável contínua, usamos uma regressão múltipla padrão para prever a expressão gênica com base em várias variáveis independentes (contínuas ou categóricas). Ela foi executada para levar em conta a possível importância do tabagismo, do consumo de álcool, da duração da exposição e de outros fatores que poderiam influenciar a expressão dos genes mais significativos. Foram testadas as suposições de linearidade, independência de erros, homocedasticidade, pontos incomuns e normalidade dos resíduos.

As análises estatísticas foram realizadas com os pacotes de software GraphPad Prism 5 (GraphPad Prism software, La Jolla, CA, EUA) e SPSS 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA). Foi considerada uma probabilidade de erro do tipo I (valor *p*) de < 0,05.

3. Resultados

3.1. Caracterização dos agricultores

As características de 90 agricultores (50 CF, 30 F F e 10 OF), obtidas por meio do questionário, são apresentadas na Tabela 1. A média de idade foi de 41

Tabela 1

Características dos grupos de agricultores.

Parâmetros	Agricultura comercial	Agricultura familiar	Agricultura orgânica	Valor p
Número de casos (%)	50/90 (55.5)	30/90 (33.3)	10/90 (11.2)	
Idade da mídia (anos)	41 (22-62)	50 (32-69)	46 (32-60)	0.735
Gênero (n/%)				
Masculino	48 (96.0)	30 (100.0)	10 (100.0)	
Feminino	2 (4.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	
Suocomeamento (n/%)				
Sim	12 (25.5)	2 (7.4)	2 (20.0)	
Não	35 (74.5)	25 (92.6)	8 (80.0)	.160
Álcool (n/%)				
Sim	27 (57.5)	15 (55.6)	7 (70.0)	
Não	20 (42.5)	13 (44.6)	3 (30.0)	.664
Histórico familiar de câncer				
Sim	14 (36.8)	13 (54.2)	6 (60.0)	
Não	24 (63.2)	11 (45.8)	4 (40.0)	.257
Anos de exposição (n/%)				
< 5 anos	8 (17.0)	1 (3.3)	-	
5 a 12 anos	4 (8.5)	3 (10.0)	-	.189
≥ 12 anos	35 (74.5)	26 (86.7)	-	
Anos de exposição (n/%)				
< 12 anos	12 (25.5)	4 (13.3)	-	
≥ 12 anos	35 (74.5)	26 (86.7)	-	.198
Uso de EPI (n/%)				
Máscara				
Sim	23 (46.0)	12 (40.0)	-	
Não	27 (54.0)	18 (60.0)	-	.600
Óculos				
Sim	16 (32.0)	9 (30.0)	-	
Não	34 (68.0)	21 (70.0)	-	.851
Chapéu				
Sim	44 (88.0)	25 (83.3)	-	
Não	6 (12.0)	5 (17.7)	-	.557
Botas				
Sim	46 (92.0)	21 (70.0)	-	
Não	4 (8.0)	9 (30.0)	-	.009
Macacão				
Sim	18 (36.0)	8 (26.7)	-	
Não	32 (64.0)	22 (73.3)	-	.388
Perfil de danos ao DNA (n/%)				
Cromossômico				
Anormalidades				
Cariótipo anormal	8/11 (72.7)	3/11 (27.3)	0/11 (0.0)	0.003

em anos. EPI equipamento de proteção individual.

anos (variação de 22 a 62 anos - grupo CF), 50 anos (variação de 32 a 69 anos - grupo FF) e 46 anos (variação de 32 a 60 anos - grupo OF). Não houve diferença significativa ($p=0,7356$) entre a idade dos grupos de trabalhadores. Os agricultores também foram estratificados quanto ao tabagismo ($p=0,160$), consumo de álcool ($p=0,664$), histórico familiar de câncer ($p=0,257$), tempo de exposição < 12 anos e ≥ 12 anos ($p=0,198$) e uso de EPI ($p>0,05$). Não houve diferença significativa para nenhuma das variáveis (Tabela 1). A Tabela 2 mostra os pesticidas usados com mais frequência. Entre os herbicidas,

Tabela 2

Descrição dos agrotóxicos mais utilizados em ordem decrescente pelos agricultores de Limoeiro do Norte - CE.

Nome comercial	Ingrediente Ativo	Classificação toxicológica **	Classificação ambiental ***	Tipo	Grupo químico
Roundup	Fosfonometil+ Glyphosate	IV	III	Herbicida	Glicina Substituída
Gramoxone 200®	Paraquat	I	II	Herbicida	Bipiridina
Folicur 200CE®	Tebuconazol	I	II	Fungicida	Triazol
Tecto SC®	Tiabendazol	III	II	Fungicida	Benzimidazol
Orius 250 EC®	Tebuconazol	III	III	Fungicida	Triazol

Legenda. ** Classes toxicológicas: I - Extremamente Tóxico; II - Muito Tóxico; III - Moderadamente Tóxico; IV - Pouco Tóxico. *** Classes ambientais: I - Altamente Perigoso, II - Muito Perigoso, III - Perigoso, IV - Pouco Perigoso.

Fonte: Rigotto²⁸, 2011.

a associação Fosfonometil+ O glifosato foi relatado como o mais usado, seguido pelo paraquat. Com relação aos fungicidas, o tebuconazol e o tiabendazol foram os mais aplicados (Tabela 2).

Foram realizadas análises citogenéticas em todos os agricultores ($n=90$).

De

desses, 40 (44,4 %) apresentaram resultados de análise de cariótipo (Tabela 3) e

55,4 % dos agricultores não apresentaram metáfases. Anormalidades cromossômicas

foram detectadas em 11/40 (27,5%), com 8/11 (72,7%), 3/11 (27,3%) e 0/11 (0%) casos relacionados a FC, FF e OF, respectivamente (Tabela 1). De

Tabela 3

Descrição detalhada do cariótipo das células da medula óssea de 40 agricultores.

Caso	Idade/gênero	Cariótipo - um sistema internacional para citogenética humana (ISCN) 2014	Grupos de trabalhadores
1	25/M	46,XY[20]	CF
2	34/M	46,XY[15]	CF
3	29/M	46,XY[20]	CF
4	33/M	46,XY[11]	CF
5	31/M	46,XY[20]	CF
6	52/M	46,XY[30]	CF
7	53/M	46,XY,add(4)(?q35)[4]/46,XY[16]	CF
8	48/M	46,XY[7]	CF
9	25/M	46,XY[6]	CF
10	43/M	46,XY,del(11)(q23)[4]/46,XY[16]	CF
11	49/M	44,XY,-20,-21[8]/46,XY[2]	CF
12	25/M	46,XY[20]	CF
13	43/M	46,XY[15]	CF
14	34/M	46,XY,add(4)(?q35)[3]/46,XY[16]	CF
15	28/M	46,XY[10]	CF
16	51/M	46,XY[10]	CF
17	54/M	25,+4[3]/33,+1,+2,+5,+10+ 16,+17,+18,+19,+21,+22[3]/43,-10,-16,-Y[3]	CF
18	62/M	32-45,XY,-1,-18,-7,-14,-16[cp9]	CF
19	41/F	46,XX,del(18)(p11.21)[4]/46,XX[22]	CF
20	36/M	46,XY[10]	CF
21	64/M	46,XY[5]	CF
22	60/M	46,XYdel(11)(q23)[3]/46,XY[17]	CF
23	27/M	46,XY[20]	CF
24	50/M	46,XY[10]	FF
25	49/M	46,XY[20]	FF
26	45/M	46,XY[10]	FF
27	53/M	47,XY,+mar[4]/46,XY[18]	FF
28	42/M	20-30,+1,+14,+16,+18,+21,+22[5]/45,XY[5]	FF
29	54/M	46,XY[7]	FF
30	34/M	46,XY[20]	FF
31	46/M	18-35,XY,-4,-5,-8,-9,-11,-16,-17,-19,-20,-21,-22[8]/46,XY[2]	FF
32	57/M	46,XY[20]	FF
33	60/M	46,XY[25]	OF
34	43/M	46,XY[15]	OF
35	32/M	46,XY[15]	OF
36	59/M	46,XY[4]	OF
37	53/M	46,XY[20]	OF
38	56/M	46,XY[17]	OF
39	40/M	46,XY[7]	OF
40	50/M	46,XY[10]	OF

Legenda: IM: Masculino; F: Feminino; CF: Agricultura comercial; FF: Agricultura familiar; OF: Agricultura orgânica; Mar= cromossomo marcador; del= deleção. [] Número de metáfases analisadas.

Com base nesses dados, pode-se concluir que a presença de anormalidades cromossômicas nos grupos FC e FF foi estatisticamente maior do que no grupo OF ($p = 0,003$) (Tabela 1). As anormalidades mais comuns foram as aneuploidias (presença de um número anormal de cromossomos em uma célula). Modificações estruturais (alterações na morfologia cromossômica), como del (11), del (18) e add (4), também foram identificadas (Tabela 3).

3.2. Expressão de mRNA

3.2.1. Os genes de reparo do DNA são regulados para baixo em agricultores expostos a pesticidas

Avaliamos a expressão de mRNA de SSB (*XPC*, *XPA*, *XPG*, *CSB* e *CSA*), DSB-HR (*ATM*, *BRCA1*, *BRCA2*, *RAD51*) e DSB-NHEJ (*XRCC5*-ku80, *XRCC6*-ku70, *LIG4*) comparando os três grupos: Agricultura comercial (CF); agricultura familiar (FF) e agricultura orgânica (OF) de todos os participantes ($n = 90$) (Tabela suplementar 1).

Foi observada uma diferença significativa entre os três grupos. O grupo FC apresentou uma regulação negativa significativa na expressão de mRNA de *XPG* ($p = 0,008$; 95% CI = 0,0041558-0,0150491), *CSA* ($p < 0,001$; 95% CI = 0,0000008-0,0002348), *ATM* ($p = 0,036$; 95% CI = 0,000625306-0,020115306) e *LIG4* ($p = 0,004$; 95% CI = 0,00655793-0,028770529) em comparação com o grupo OF. Da mesma forma, os participantes do FF também apresentaram níveis significativamente mais baixos de mRNA de *XPG* ($p = 0,012$; IC95% = 0,010001 - 0,145387), *ATM* ($p = 0,02$; = 0,0005305-0,000088) e *LIG4* ($p = 0,004$; 95% CI = 0,006518560-0,028919468) do que os indivíduos OF. (Fig. 2A, B, E, F). Não houve diferenças estatisticamente significativas para *XPC* ($p = 0,051$), *XPA* ($p = 0,168$), *CSB* ($p = 0,363$), *BRCA1* ($p = 0,770$), *BRCA2* ($p = 0,562$), *RAD51* ($p = 0,125$), *XRCC5*-ku80 ($p = 0,286$) e *XRCC6*-ku70 ($p = 0,665$). Veja Tabela suplementar 1.

Para a análise de acompanhamento, dividimos os indivíduos em dois grupos com base na presença (grupos CF e FF) ou ausência (grupo OF) de exposição ambiental a pesticidas. Detectamos uma regulação negativa na expressão de mRNA de *XPG* ($p = 0,004$; IC de 95% = 0,0015982-0,0124895), *CSA* ($p = 0,009$; IC de 95% = 0,000088-0,0003065) e *LIG4* ($p = 0,002$; 95% CI = 0,0087933372-0,0267322557) no grupo exposto a pesticidas (Fig. 2C, D, G). Não houve diferenças estatisticamente significativas para *XPC* ($p = 0,162$), *XPA* ($p = 0,058$), *CSB* ($p = 0,284$), *ATM* ($p = 0,089$), *BRCA1* ($p = 0,597$), *BRCA2* ($p = 0,539$), *RAD51* ($p = 0,548$), *XRCC5*-ku80 ($p = 0,455$) e *XRCC6*-ku70 ($p = 0,104$) (Tabela suplementar 2).

3.2.2. A regulação negativa dos genes de reparo do DNA parece depender tempo de exposição em agricultores expostos a pesticidas

Entre os agricultores expostos a pesticidas, dividimos os grupos em dois, de acordo com o intervalo de exposição (ou seja, agricultores com 12 anos ou mais de exposição a agroquímicos e agricultores com menos de 12 anos). Detectamos que aqueles com 12 anos de exposição apresentaram uma diminuição na expressão gênica de *XPC* ($p = 0,001$; IC95% = 0,0034934-0,0356410), *XPG* ($p = 0,010$; IC95% = 0,0015982-0,0124895), *CSB* ($p = 0,05$; = 0,0003037-0,0034931), *ATM* ($p = 0,030$; IC95% = 0,0007262385-0,0133437807) e *LIG4* ($p = 0,044$; IC95% = 0,0002129550-0,0135447272) (Fig. 3A-E). Não encontramos diferenças estatisticamente significativas para os outros genes: *XPA* ($p = 0,667$), *CSA* ($p = 0,189$), *BRCA1* ($p = 0,186$), *BRCA2* ($p = 0,466$), *RAD51* ($p = 0,273$), *XRCC5*-ku80 ($p = 0,413$) e *XRCC6*-ku70 ($p = 0,548$) (Tabela suplementar 3).

3.2.3. Anormalidades cromossômicas em agricultores expostos a pesticidas estão associadas à baixa expressão de *BRCA2*

Os agricultores expostos a pesticidas que apresentaram anomalias cromossômicas mostraram baixa expressão de *BRCA2* em comparação com os expostos a pesticidas sem anomalias cromossômicas ($p = 0,007$; 95% CI = 0,0084937539-0,0480907490) (Fig. 4). Não encontramos diferenças significativas em relação aos níveis de expressão gênica de *XPA* ($p = 0,866$), *XPC* ($p = 0,317$), *XPG* ($p = 0,140$), *CSA* ($p = 0,770$), *CSB* ($p = 0,780$), *ATM* ($p = 0,836$), *LIG4* ($p = 0,062$), *BRCA1* ($p = 0,668$), *RAD51* ($p = 0,157$), *XRCC5*-ku80 ($p = 0,334$) e *XRCC6*-ku70 ($p = 0,498$) (Tabela 4suplementar).

3.3. A expressão dos genes de reparo do DNA está correlacionada em agricultores expostos a pesticidas

Usando a análise de correlação de Pearson, encontramos correlações intragrupo entre os genes pertencentes à mesma classe de reparo de quebra, ou seja, SSB e DSB, em agricultores expostos a pesticidas (Tabela 4).

Para os genes da via SSB, foram identificadas correlações positivas entre *XPG* e *CSB* ($r = 0,821$; $p = 0,000$) (Fig. Suplementar 1A). 1A), *XPC* e *CSB* ($r = 0,658$; $p = 0,000$), *XPC* e *XPG* ($r = 0,641$; $p = 0,000$), *XPA* e *CSB* ($r = 0,635$; $p = 0,000$), *XPA* e *XPG* ($r = 0,627$; $p = 0,000$), *XPG* e *CSA* ($r = 0,536$; $p = 0,000$), *CSA* e *CSB* ($r = 0,515$; $p = 0,000$), *XPA* e *XPC* ($r = 0,496$; $p = 0,000$) e *XPA* e *CSA* ($r = 0,327$; $p = 0,019$).

Quanto aos genes DSB, também foram identificadas correlações positivas entre vários marcadores: *BRCA1* e *RAD51* ($r = 0,770$; $p < 0,000$)

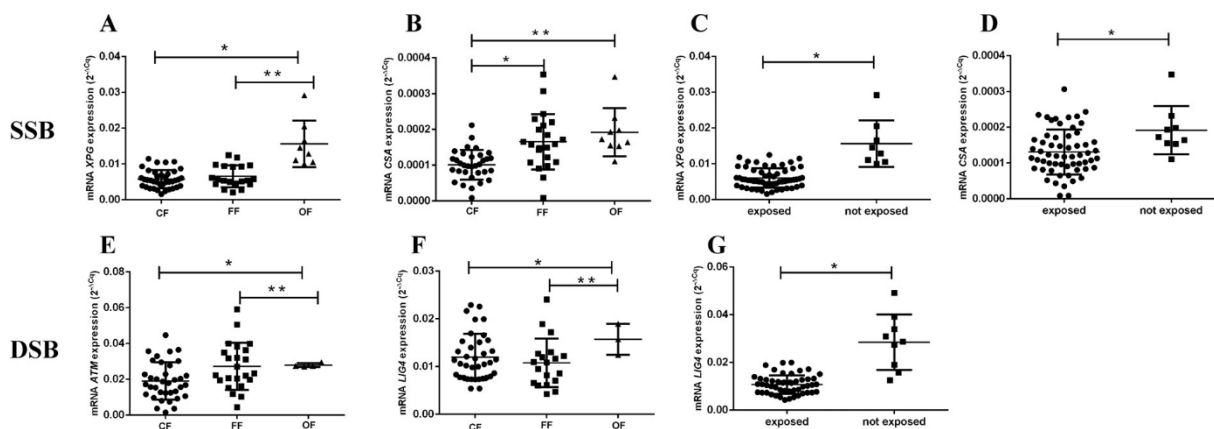


Fig. 2. Análise dos genes de reparo do DNA de acordo com os grupos de agricultores.

Legenda. A. Expressão do mRNA XPG em grupos de agricultores. B. Expressão do mRNA CSA em grupos de agricultores. C. Expressão do mRNA XPG nos grupos expostos e não expostos.

D. Expressão do mRNA CSA nos grupos expostos e não expostos. E. Expressão do mRNA ATM de acordo com os grupos de agricultores. F. Expressão do mRNA LIG4 nos grupos de agricultores. G. Expressão do mRNA LIG4 nos grupos expostos e não expostos. O asterisco indica diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre os grupos. SSB: Genes relacionados à via de reparo do DNA por quebra de fita simples. DSB: Genes relacionados à via de reparo de DNA por quebra de fita dupla. CF. agricultura comercial. FF. agricultura familiar. OF. Agricultura orgânica.

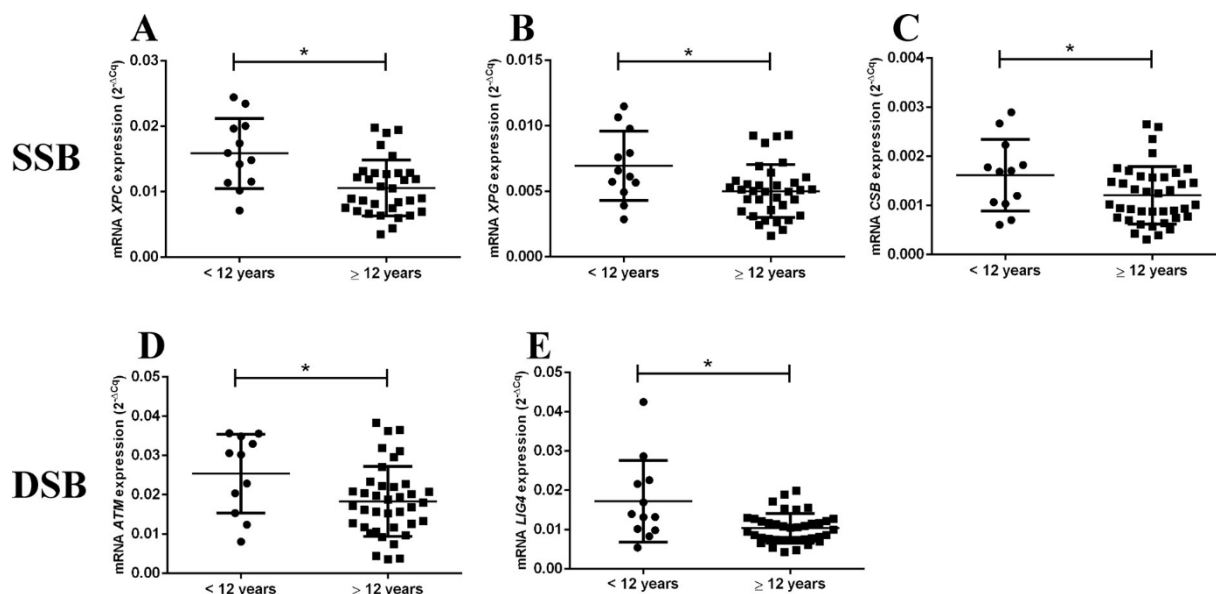


Fig. 3. Análise dos genes de reparo do DNA de acordo com o tempo de exposição aos agroquímicos.

Legenda. A. Expressão do mRNA XPC em relação ao tempo de exposição a agrotóxicos. B. Expressão do mRNA XPG em relação ao tempo de exposição aos agrotóxicos. C. Expressão do mRNA CSB em relação ao tempo de exposição aos agrotóxicos. D. Expressão do mRNA ATM em relação ao tempo de exposição aos agrotóxicos. E. Expressão do mRNA LIG4 em relação ao tempo de exposição aos agrotóxicos. O asterisco indica diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre os grupos. SSB: Genes relacionados à via de reparo de DNA por quebra de fita simples. DSB: Genes relacionados à via de reparo de DNA por quebra de fita dupla.

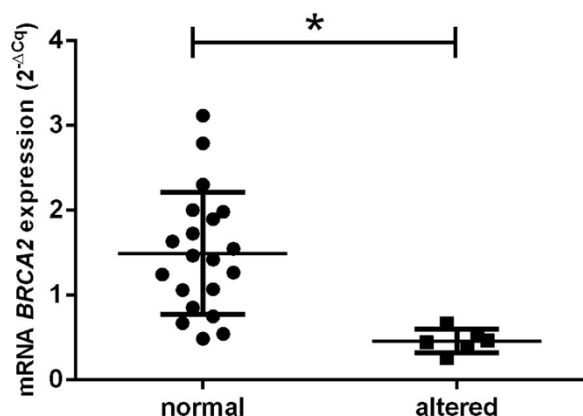


Fig. 4. Análise dos genes de reparo do DNA de acordo com o cariótipo.

Legenda. Expressão do mRNA de BRCA2 de acordo com o cariótipo. O asterisco indica diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre os grupos. DSB: Genes relacionados à via de reparo do DNA por quebra de fita dupla.

(Fig. 1B Suplementar), *BRCA1* e *XRCC5-ku80* ($r = 0,588$; $p = 0,000$), *BRCA1* e *LIG4* ($r = 0,473$; $p = 0,000$), *XRCC5-ku80* e *LIG4* ($r = 0,427$; $p = 0,002$), *BRCA1* e *BRCA2* ($r = 0,406$; $p = 0,001$), *BRCA1* e *XRCC6-ku70* ($r = 0,394$; $p = 0,002$), *ATM* e *LIG4* ($r = 0,383$; $p = 0,003$), *ATM* e *XRCC5-ku80* ($r = 0,359$; $p = 0,007$), *XRCC5-ku80* e *XRCC6-ku70* ($r = 0,304$; $p = 0,030$), *BRCA2* e *RAD51* ($r = 0,268$; $p = 0,03$) e *BRCA2* e *XRCC6-ku70* ($r = 0,267$; $p = 0,03$).

Esses resultados reforçam que esses genes funcionam de forma dependente como uma cascata de eventos em agricultores expostos a pesticidas, indicando que a exposição a agrotóxicos pode causar alterações nos níveis de expressão dos genes de reparo do DNA, provavelmente afetando, de forma independente, as vias de reparo por SSB e DSB.

4. Discussão

A instabilidade genômica causada por lesões no DNA ou exposição ambiental genotóxica pode causar danos genéticos e, portanto, levar à

ocorrência de carcinogênese, especialmente quando ocorre dano ao mecanismo de reparo (Kvitko et al., 2012; Benedetti et al., 2017). Os ensaios citogenéticos e moleculares são de fundamental importância para definir a predisposição, o diagnóstico e o prognóstico das neoplasias hematológicas e têm alto valor na identificação dos efeitos dos pesticidas (Prakash et al., 2016; Chaves et al., 2016).

Descobrimos que o número de anormalidades cromossômicas nos grupos CF e FF foi significativamente maior do que no grupo OF. Pajic et al. (2017) realizaram um estudo de coorte com 219 casos (99 controles versus 120 expostos) para avaliar a presença de alterações citogenéticas em linfócitos do sangue periférico como um marcador de danos ao DNA em uma população sérvia exposta ou não a pesticidas. Os autores identificaram que as pessoas expostas a pesticidas apresentaram valores significativamente mais altos de parâmetros de aberração cromossômica (ou seja, quebras de cromátides e isocromátides) em comparação com o grupo de controle (Pajic et al., 2017), demonstrando a importância da análise citogenética como um marcador de danos ao DNA em resposta à exposição a fatores genotóxicos. No entanto, a avaliação de anormalidades cromossômicas em células do sangue periférico não é um verdadeiro preditor de alterações clonais, uma vez que as neoplasias hematológicas correspondem a doenças originadas em células-tronco hematopoiéticas.

Portanto, nossos resultados são úteis para explicar a associação entre a exposição a pesticidas e o desenvolvimento de neoplasias hematológicas, uma vez que essas alterações citogenéticas também podem ser identificadas em doenças hematológicas malignas, como leucemia e síndrome mielodisplásica (Rack et al., 2019). Assim, reafirmamos que a análise citogenética das células da medula óssea é um parâmetro confiável para avaliar danos ao DNA em indivíduos expostos a pesticidas, pois reflete o real impacto maligno dessa exposição ocupacional.

Nossos resultados demonstraram que a presença de danos ao DNA e anormalidades cromossômicas em trabalhadores rurais pode estar relacionada a mudanças no perfil de expressão dos genes de reparo do DNA. Detectamos que alguns dos genes de reparo do DNA foram regulados negativamente em agricultores expostos a pesticidas. O grupo de agricultura industrial apresentou menor expressão de *CSA*, *XPG*, *ATM* e *LIG4* em comparação com a agricultura orgânica. É importante observar que o *CSA* e o *ATM* são os principais sinalizadores celulares do reparo do DNA. Da mesma forma, o *XPG* é um verdadeiro efetor do reparo da classe SSB, enquanto o *LIG4* funciona de forma semelhante para o DSB (NHEJ). Da mesma forma, o grupo de agricultura familiar também apresentou *XPG* e *LIG4* mais baixos em comparação com o grupo de agricultura orgânica,

Tabela 4

Análise de correlação de *Pearson* entre genes de reparo de DNA das classes SSB (canto superior esquerdo) e DSB (canto inferior direito) em agricultores expostos a pesticidas. Os valores de *r* de *Pearson* são informados na metade inferior esquerda, enquanto os valores de *p* são mostrados na metade superior direita, acima da diagonal. Observe que as correlações entre os genes das classes SSB e DSB não alcançaram significância.

SSB genes							DSB genes							p-value (2-tailed)
GENES	XPA	XPC	XPG	CSA	CSB	ATM	BRCA1	BRCA2	RAD51	XRCC5	XRCC6	LIG4		
SSB genes	XPA		0.000*	0.000*	0.019*	0.000*	0.727	0.688	0.699	0.912	0.980	0.452	0.740	
	XPC	0.496		0.000*	0.752	0.000*	0.882	0.936	0.201	0.984	0.834	0.127	0.545	
	XPG	0.627	0.641		0.000*	0.000*	0.919	0.423	0.331	0.986	0.448	0.584	0.956	
	CSA	0.327	0.043	0.536		0.000*	0.998	0.138	0.870	0.377	0.448	0.584	0.148	
	CSB	0.635	0.658	0.821	0.515		0.368	0.987	0.868	0.515	0.941	0.498	0.749	
DSB genes	ATM	0.051	-0.020	-0.014	0.000	-0.124		0.478	0.079	0.863	0.007*	0.349	0.003*	
	BRCA1	-0.059	-0.011	-0.110	0.195	0.002	0.088		0.001*	0.000*	0.000*	0.002*	0.000*	
	BRCA2	0.055	0.172	0.131	0.022	0.023	0.216	0.406		0.030*	0.251	0.039*	0.097	
	RAD51	-0.016	-0.003	-0.113	-0.004	0.091	-0.022	0.770	0.268		0.000*	0.017*	0.326	
	XRCC5	0.004	-0.031	-0.082	0.191	0.011	0.359	0.588	0.155	0.617		0.030*	0.020*	
	XRCC6	-0.118	-0.226	0.003	0.121	-0.101	0.124	0.394	0.267	0.317	0.304		0.022*	
	LIG4	-0.049	-0.085	-0.008	0.200	-0.045	0.383	0.473	0.220	0.136	0.427	0.320		
Pearson's r														

Pearson's *r*

Legenda: A escala de cinza é progressivamente mais escura de acordo com o grau de correlação *r* de *Pearson* e a significância dos valores de *p* (2 tailed) mostrados acima. Os asteriscos em negrito indicam valores significativos ($p \leq 0,05$).

o que sugere que a exposição a pesticidas pode ser a principal responsável por essa regulação negativa.

É relevante o fato de que nosso estudo foi realizado em uma região bem delimitada, que frequentemente tem sido relatada como tendo contaminação do ar, do solo e da água por pesticidas (Rigotto et al., 2013; Ferreira e Viana Júnior, 2015; Gama et al., 2017). Nosso grupo de referência (controle) consistiu em trabalhadores agrícolas que viviam na mesma região, sobrepondo-se no tempo e no espaço aos grupos de exposição, que trabalhavam apenas com agricultura orgânica e não eram expostos a pesticidas (agricultura orgânica).

Entre os trabalhadores agrícolas expostos (grupos CF e FF), o pesticida com o maior uso relatado foi o glifosato, que é classificado como 2A (provavelmente carcinogênico para humanos) de acordo com a IARC (International Agency for Research on Cancer, 2014). A associação do glifosato com danos ao DNA foi relatada anteriormente em peixes e mamíferos (Moya et al., 2014). Braz-Mota et al. (2015) avaliaram os efeitos tóxicos do glifosato em juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*), um peixe muito importante da Amazônia no Brasil, detectando um aumento nos danos ao DNA em células de tambaqui expostas ao glifosato. Mais recentemente, Townsend et al. (2017) avaliaram as concentrações de glifosato sobre os danos ao DNA usando células Raji humanas e demonstraram que a citotoxicidade do glifosato tinha uma natureza citotóxica definitiva em células humanas em altas concentrações, conforme demonstrado com altos danos ao DNA detectados pelo ensaio cometa. Koller et al. (2012) também avaliaram os danos ao DNA do glifosato em uma linha de células epiteliais bucais derivadas de humanos e encontraram efeitos genotóxicos significativos após uma curta exposição a concentrações que correspondem a uma diluição de 450 vezes da pulverização normalmente usada na agricultura.

Outro pesticida mais relatado foi o paraquat, que também foi associado a danos ao DNA (Ali et al., 1996; Feng e Kathleen, 2012) e à regulação negativa de proteínas antiapoptóticas (Hathaichoti et al., 2017). Todos esses resultados reforçam o efeito mutagênico de ambos os pesticidas, mas o mecanismo real de sua indução de danos ao DNA ainda não é totalmente compreendido. Nosso relatório é o primeiro a sugerir um possível efeito desses pesticidas na diminuição da expressão dos genes de reparo do DNA nas células da medula óssea, o que pode ter um profundo impacto a jusante, levando a condições crônicas progressivas, como o câncer.

A regulação negativa dos genes de reparo do DNA também parece ser dependente do tempo em agricultores expostos a pesticidas. Detectamos que os genes de quebra de fita simples (*XPC*, *XPG* e *CSB*) e de fita dupla (*ATM* e *LIG4*) apresentaram expressão mais baixa em agricultores expostos a pesticidas por mais de 12 anos do que naqueles que apresentaram menos de 12 anos. Câncer

O câncer de medula óssea é um processo que depende do tempo e os estudos epidemiológicos demonstraram que, em geral, são necessários vários anos de exposição para o desenvolvimento do câncer de medula óssea, mas também depende do tipo de agente exposto. Jie Jin et al. (2014) avaliaram a exposição a pesticidas como fator de risco para as síndromes mielodisplásicas, o câncer de medula óssea mais comum do mundo ocidental, em uma meta-análise de onze estudos de caso-controle e detectaram um forte efeito responsável por um aumento de 63% no risco de desenvolvimento das características iniciais da SMD (anemia refratária (AR) e anemia refratária com sideroblastos em anel). Uma avaliação muito recente de câncer em uma população de 70.570 trabalhadores agrícolas do Canadá mostrou que o risco de desenvolver leucemia era significativamente elevado entre os agricultores, com os agricultores de garupa apresentando um aumento de 2 vezes no risco de desenvolver mieloma múltiplo (Kachuri et al., 2017).

Nosso trabalho indicou que as anormalidades cromossômicas eram frequentes entre os indivíduos expostos e estavam associadas à menor expressão de *BRCA2*. Até onde , este é o primeiro relatório a avaliar o cariótipo das células da medula óssea de agricultores aparentemente saudáveis expostos a pesticidas. Ficamos surpresos com a detecção comum de anormalidades cromossômicas, como aneuploidia e deleção de 11q nesses participantes, já que esses são defeitos geralmente detectados em distúrbios da medula óssea de pacientes com leucemia e MDS. Podemos especular que os níveis mais baixos de expressão do *BRCA2*, um importante gene de reparo de quebra de fita dupla, podem ser uma etapa crucial para o desenvolvimento dessas anormalidades. As mutações do *BRCA2* têm sido amplamente associadas a anormalidades estruturais dos telômeros, o que pode predispor os indivíduos a alterações cromossômicas. O *BRCA2* também é essencial para a correção de intermediários de reparo de danos oxidativos ao DNA que persistem na fase S e produzem quebras de fita dupla (Fridlich et al., 2015; Uziel et al., 2016). Essas proposições devem ser cuidadosamente avaliadas em modelos *in vitro* ou murinos.

No entanto, é preciso enfatizar que é extremamente desafiador obter células frescas da medula óssea para cultura e expressão de RNA de agricultores expostos a pesticidas, dada sua localização, acessibilidade e devido à invasividade do procedimento de coleta dessas amostras. Não podemos descartar que as associações observadas possam refletir uma série de outros fatores, inclusive a predisposição genética. Embora esses resultados devam ser interpretados com cautela, uma vez que essas mutações predisponentes também podem funcionar de maneira semelhante e encontramos correlações de expressão significativas entre vários genes investigados, acreditamos que as associações detectadas não foram por acaso devido à existência de literatura de apoio que associa os pesticidas a danos cumulativos em

Sistemas de reparo de DNA (Benedetti et al., 2017; Kwiatkowska et al., 2017; Kaur e Kaur, 2018).

Em conclusão, até sabemos, este é o primeiro estudo a realizar a análise de cromossomos parados e a desregulação do painel de expressão de genes de reparo do DNA em células da medula óssea de trabalhadores agrícolas. Esses resultados destacam que a exposição genotóxica a pesticidas afeta negativamente o perfil de expressão de importantes genes de reparo do DNA nas células-tronco da medula óssea de agricultores, favorecendo o envolvimento de lesões cromossômicas irreparáveis, que podem levar ao desenvolvimento de uma doença maligna.

Enfatizamos a importância da necessidade urgente de estudos *in vitro* e modelos *in vivo* para avaliar melhor essas prováveis alterações que, em que foi observada uma notável regulação negativa dos genes de reparo do DNA em agricultores expostos a pesticidas em comparação com indivíduos de agricultura orgânica que eram demograficamente semelhantes e compartilhavam a mesma região geográfica.

Declaração de contribuição de autoria do CRediT

Marília Braga Costa: Conceitualização, Metodologia, Análise formal, Investigação, Redação - rascunho original. **Isabelle Rocha Farias:** Conceitualização, Metodologia, Análise formal, Investigação, Redação - rascunho original. **Cristiane da Silva Monte:** Análise formal, Redação - rascunho original. **Luiz Ivando Pires Ferreira Filho:** Investigação. **Daniela de Paula Borges:** Investigação. **Roberta Taiane Germano de Oliveira:** Investigação. **Howard Lopes Ribeiro-Junior:** Redação - rascunho original, Redação - revisão e edição. **Silvia Maria Meira Magalhaes:** Redação - revisão e edição. **Ronald Feitosa Pinheiro:** Conceitualização, Supervisão, Administração do projeto, Redação - revisão e edição.

Declaração de interesse concorrente

Os autores não relatam declarações de interesse.

Agradecimentos

Este estudo foi realizado com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) e da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

Apêndice A. Dados suplementares

O material suplementar relacionado a este artigo pode ser encontrado, versão on-line, em doi: <https://doi.org/10.1016/j.etap.2020.103564>.

Referências

- Alekseev, S., Coin, F., 2015. Manobras orquestrais nos locais danificados no reparo de excisão de nucleotídeos. *Cell. Mol. Life Sci.* 72 (11), 2177–2186. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-1859-5>.
- Araújo, A.J., Lima, J.S., Moreira, J.C., Jacob, S.C., Soares, M.O., Monteiro, M.C.M., Amaral, A.M., Kubota, A., Meyer, A., Cosenza, C.A.N., Neves, C., Markowitz, S., 2007. Exposição ao múltiplo agrotóxicos e efeitos à saúde: estudo transversal em amostra de 102 trabalhadores rurais. *Ciênc. Saúde. Colet.* 12 (1), 115–130. <https://doi.org/10.1590/S1413-81232007000100015>.
- Benedetti, D., Lopes Alderete, B., de Souza, C.T., Ferraz Dias, J., Niekaszewicz, L., Cappetta, M., Martínez-López, W., Da Silva, J., 2017. Danos ao DNA e alterações epigenéticas em produtores de soja expostos a uma mistura complexa de pesticidas. *Mutagenesis* 33 (1), 87–95. <https://doi.org/10.1093/mutage/gex035>.
- Braz-Mota, S., Sadauskas-Henrique, H., Duarte, R.M., Val, A.L., Almeida-Val, V.M., 2015. A exposição ao Roundup® promove deficiências nas brânquias e no fígado, danos ao DNA e inibição da atividade colinérgica cerebral no peixe teleosteo amazônico *Colossoma macropomum*. *Chemosphere* 135, 53–60. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.03.042>.
- Budden, T., Bowden, N.A., 2013. Altered nucleotide excision repair and UVB-Induced DNA damage in Melanomagenesis (Reparo de excisão de nucleotídeos alterado e danos ao DNA induzidos por UVB na melanogênese). *Int. J. Mol. Sci.* 14, 1132–1151. <https://doi.org/10.3390/ijms14011132>.
- Chaves, T.V.S., Amaral, F.P.D.M., Amaral, G., Lemos, S., Leite, A.S., Neto, J.F., Cavalcante, A.A.C.M., Monte, S.M., Moraes, M., Moraes, M., 2016. Citogenética, Parâmetros Hematológicos e de Níveis de Enzimas no Biomonitoramento de Agricultores Trabalhadores Expostos a Pesticidas no Estado do Piauí, Brasil. *Int. J. Pharm. Sci. Invent.* 5 (4), 27–34.
- Chen, Q., Niu, Y., Zhang, R., Guo, H., Gao, Y., Li, Y., Liu, R., 2010. The toxic influence of paraquat on hippocampus of mice: involvement of oxidative stress (A influência tóxica do paraquat no hipocampo de camundongos: envolvimento do estresse oxidativo). *Neurobehav. Toxicol. Teratol.* 31 (3), 310–316. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2010.02.006>.
- Cocco, P., Satta, G., Dubois, S., Pili, C., Pilleri, M., Zucca, M., 't Mannetje, A.M., Becker, N., Benavente, Y., de San José, S., Foretova, L., Staines, A., Maynadi, M., Nieters, A., Brennan, P., Miligi, L., Ennas, M.G., Boffetta, P., 2013. Lymphoma risk and occupational exposure to pesticides: results of the Epilymph study (Risco de linfoma e exposição ocupacional a pesticidas: resultados do estudo Epilymph). *Occup. Med.* 70, 91–98. <https://doi.org/10.1136/oemed-2012-100845>.
- Feng, L.R., Kathleen, A.M.Z., 2012. A dopamina e o paraquat aumentam as alterações induzidas α-sinucleína na condutância da membrana. *Neurotox. Res.* 20 (4), 387–401. <https://doi.org/10.1007/s12640-011-9255-x>.
- Ferreira, M.J.M., Viana Júnior, M.M., 2015. A expansão do agronegócio no Ceará: uma região semiárida e suas implicações para a saúde, o trabalho e o meio ambiente. *Interface* (Botucatu) 20 (58), 649–660. <https://doi.org/10.15406/mojt.2017.03.00060>.
- Fridlich, R., Annamalai, D., Roy, R., Bernheim, G., Powell, S.N., 2015. BRCA1 e BRCA2 protegem contra danos oxidativos ao DNA convertidos em quebras de fita dupla durante a replicação do DNA. *DNA Repair (Amst)* 30, 11–20. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2015.03.002>.
- Gama, A.F., Cavalcante, R.M., Duavi, W.C., Silva, V.P.A., Nascimento, R.F., 2017. Ocorrência, distribuição e destino de pesticidas em uma região de agricultura intensiva nos trópicos semiáridos brasileiros (Rio Jaguaribe, Ceará). *J. Soils Sediments* 17, 1160–1169. <https://doi.org/10.1007/s11368-016-1597-9>.
- Gunier, R.B., Kang, A., Hammond, S.K., Reinier, K., Lea, C.S., Chang, J.S., Does, M., Seelo, G., Kirsch, J., Crouse, V., Cooper, R., Quinlan, P., Metayer, C., 2017. A task-based assessment of parental occupational exposure to pesticides and childhood acute lymphoblastic leukemia (Uma avaliação baseada em tarefas da exposição ocupacional dos pais a pesticidas e leucemia linfoblástica aguda infantil). *Environ. Res.* 156, 57–62. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.03.001>.
- Hathaichoti, S., Visitnonthachai, D., Ngamsiri, P., Niyomchan, A., Tsogtbayar, O., Wisessaowapak, C., Watcharasi, P., Satayavivad, J., 2017. O paraquat induz a via extrínseca da apoptose em células A549 por indução de DR5 e repressão de proteínas antiapoptóticas, expressão de DDX3 e GSK3. *Toxicol. Virol.* 42, 123–129. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.04.016>.
- Hernández, A.F., Menéndez, P., 2016. Ligação da exposição a pesticidas com a leucemia pediátrica: possíveis mecanismos subjacentes. *Int. J. Mol. Sci.* 17 (4), 461. <https://doi.org/10.3390/ijms17040461>.
- Hoeijmakers, J.H., 2009. DNA damage, aging, and cancer (Danos ao DNA, envelhecimento e câncer). *N. Engl. J. Med.* 8 (15), 1475–1485. <https://doi.org/10.1056/NEJMr0804615>, 361.
- IARC - Monografias sobre a avaliação de riscos carcinogênicos para seres humanos, 2014. Relatório Grupo Consultivo para Recomendar Prioridades para as Monografias da IARC Durante 2015-2019. Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer, Lyon.
- Iyama, T., Wilson, D.M., 2013. Mecanismos de reparo de DNA em células que se dividem e não se dividem. *DNA Repair (Amst.)* 12 (8), 620–636. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2013.04.015>.
- Jin, J., Yu, M., Hu, C., Ye, L., Xie, L., Jin, J., Chen, F., Tong, H., 2014. Pesticide exposure as a risk factor for myelodysplastic syndromes: a meta-analysis based on 1,942 cases and 5,359 controls. *PLoS One* 9 (10), e110850. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110850>.
- Kachuri, L., Harris, M.A., MacLeod, J.S., Tjepkema, M., Peters, P.A., Demers, P.A., 2017. Riscos de câncer em um estudo de base populacional de 70.570 trabalhadores agrícolas: resultados censo canadense de saúde e coorte ambiental (CanCHEC). *BMC Câncer* 17, 343. <https://doi.org/10.1186/s12885-017-3346-x>.
- Kaur, K., Kaur, R., 2018. Occupational pesticide exposure, impaired DNA repair, and diseases (Exposição a pesticidas ocupacionais, reparo de DNA prejudicado e doenças). *Indian J. Occup. Environ. Med.* 22 (2), 74–81. https://doi.org/10.4103/ijoom.IJOEM.45_18.
- Koller, V.J., Fühacker, M., Nersisyan, A., Mišić, M., Eisenbauer, M., Knasmueller, S., 2012. Cytotoxic and DNA-damaging properties of glyphosate and Roundup in human-derived buccal epithelial cells. *Arch. Toxicol.* 86 (5), 805–813. <https://doi.org/10.1007/s00204-012-0804-8>.
- Kvitko, K., Bandinelli, E., Henriques, J.A., Heuser, V.D., Rohr, P., da Silva, F.R., Schneider, N.B., Fernandes, S., Ancines, C., da Silva, J., 2012. Suscetibilidade a danos no DNA em trabalhadores ocupacionalmente expostos a pesticidas, a produtos químicos de cortume e a poeira de carvão durante a mineração. *Genet. Mol. Biol.* S ao Paulo 35 (4), 1060–1068. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572012000600022>.
- Kwiatkowska, M., Reszka, E., Woźniak, K., Jabłońska, E., Michałowicz, J., Bukowska, B., 2017. Danos ao DNA e metilação induzidos pelo glifosato em células mononucleares do sangue periférico humano (estudo in vitro). *Food Chem. Toxicol.* 105, 93–98. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.03.051>.
- Marteijn, J., Lans, H., Vermeulen, W., Hoeijmakers, J.H.J., 2014. Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing (Entendendo o reparo de excisão de nucleotídeos e suas funções no câncer e no envelhecimento). *Mol. Cell Biol.* <https://doi.org/10.1038/nrm3822>.
- McGowan, J.J., Simons, A., Schmid, M., 2016. ISCN 2016: um sistema internacional para nomenclatura citogenômica humana. *Cytogenet. Genome Res.* 149 (1–2).
- Melis, J.P., Van Steeh, H., Luijten, M., 2013. Oxidative DNA damage and nucleotide excision repair (Dano oxidativo ao DNA e reparo de excisão de nucleotídeos). *Antioxid. Redox Signal.* 20 (18), 2409–2419. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.5036>.
- Moya, C.A., Reynoso Silva, M., Valdez Ramirez, C., Gómez Gallardo, D., Leon Sánchez, R., Canales Aguirre, A., Faria Velasco, A., 2014. Comparação da genotoxicidade in vivo e in vitro do sal de isopropilamina do glifosato em três organismos diferentes. *Genet. Mol. Biol.* 37 (1), 105–110. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572014000100016>.
- Mukata, M.M., 2012. Statistics corner: a guide to appropriate use of correlation Canto da estatística: um guia para o uso adequado do coeficiente de correlação em medical research (coeficiente na pesquisa médica). *Malawi Med. J.* 24 (3), 69–71.

- Nicolopoulou-Stamati, P., Maipas, S., Kotampasi, C., Stamatis, P., Hens, L., 2016. Pesticidas químicos e saúde humana: a necessidade urgente de um novo conceito na agricultura. *Front. Public Health* 4. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2016.00148>.
- Pajic, J., Jovicic, D., Milovanovic, A.P.S., 2017. Cytogenetic surveillance of persons occupationally exposed to genotoxic chemicals (Vigilância citogenética de pessoas ocupacionalmente expostas a produtos químicos genotóxicos). *Arch. Environ. Occup. Health* 73 (5), 313–321. <https://doi.org/10.1080/1938244.2017.1359144>.
- Pawlyn, C., Morgan, G.J., 2017. Biologia evolutiva do mieloma múltiplo de alto risco. *Nat. Rev. Cancer* 17, 543–556. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.63>.
- Petruseva, I.O., Evdokimov, A.N., Lavrik, O.I., 2014. Molecular mechanism of global genome nucleotide excision repair (Mecanismo molecular de reparo de excisão de nucleotídeos do genoma global). *Acta Naturae* 6 (1), 20. <https://doi.org/10.32607/20758251-2014-6-1-23-34>.
- Pires, A.P., et al., 2010. Sobre algumas questões epistemológicas de uma metodologia geral para as ciências sociais (Orgs.). In: POUPART, J. (Ed.), *A pesquisa qualitativa: enfoques epistemológicos e metodológicos*, 2. ed. Petrópolis-RJ, Vozes, pp. 43–94.
- Polito, L., Greco, A., Seripa, D., 2016. Genetic profile, environmental exposure, and their interaction in Parkinson's disease (Perfil genético, exposição ambiental e sua interação na doença de Parkinson). *Parkinson's Dis.* <https://doi.org/10.1155/2016/6465793>.
- Prakash, G., Kaur, A., Malhotra, P., Khadwal, A., Sharma, P., Suri, V., Varma, N., Varma, S., 2016. Current role of genetics in hematologic malignancies (Papel atual da genética em malignidades hematológicas). *Indian J. Hematol. Blood Transfusion* 32 (1), 18–31. <https://doi.org/10.1007/s12288-015-0584-4>.
- Rack, K.A., van den Berg, E., Haferlach, C., Beverloo, H.B., Costa, D., Espinet, B., Foot, N., Jeffries, S., Martin, K., O'Connor, S., Schoumans, J., Talley, P., Telford, N., Stioui, S., Zemanova, Z., Hastings, R.J., 2019. Recomendações europeias e garantia de qualidade para análise citogenômica de neoplasias hematológicas. *Leukemia* 33, 1851–1867. <https://doi.org/10.1038/s41375-019-0378-z>.
- Ribeiro, H.L.Jr., de Oliveira, R.T., Maia, A.R., Pires Ferreira Filho, L.I., de Sousa, J.C., Heredia, F.F., Magalhães, S.M., Pinheiro, R.F., 2015. Polimorfismos de genes de reparo do DNA estão relacionados à patogênese da síndrome mielodisplásica. *Hematol. Oncol.* 32. <https://doi.org/10.1002/hon.2175> n/a-n/a.
- Ribeiro Jr., H.L., Soares Maia, A.R., Costa, M.B., Farias, I.R., de Paula Borges, D., de Oliveira, R.T., de Sousa, J.C., Magalhães, S.M., Pinheiro, R.F., 2017a. Influência de polimorfismos funcionais em genes de reparo de DNA da síndrome mielodisplásica. *Leuk. Res.* 48, 62–72. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2016.06.008>.
- Ribeiro Jr., H.L., Maia, A.R.S., de Oliveira, R.T.G., Costa, M.B., Farias, I.R., de Paula Borges, D., de Sousa, J.C., Magalhães, S.M.M., Pinheiro, R.F., 2017b. Expressões de genes de reparo de DNA estão relacionadas à celularidade da medula óssea na síndrome mielodisplásica. *J. Clin. Pathol.* 70. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2016-204269> jclinpath-2016-204269-11.
- Rigotto, R.M., 2011. Pesticidas, Trabalho e Saúde: Vulnerabilidade e Resiliência no Contexto da Modernização Agrícola no Baixo Jaguaribe, CE. Edição UFCE; PopularExpressão. Fortaleza.
- Rigotto, R.M., Silva, A.M.C., Ferreira, M.J.M., Rosa, I.F., Aguiar, A.C.P., 2013. Tendências dos efeitos crônicos à saúde associados ao uso de agrotóxicos em regiões de fruticultura no estado do Ceará, Brasil. *Rev. Bras. Epidemiol.* 16 (3), 763–773. <https://doi.org/10.1590/S1415-790X2013000300019>.
- Rigotto, R.M., Vasconcelos, D.P., Rocha, M.M., 2014. Uso de agrotóxicos no Brasil e problemas para a saúde pública. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro 30 (7), 1–3. <https://doi.org/10.1590/0102-3111XPE020714>.
- Saijo, M., 2013. O papel da proteína do grupo A (CSA) da síndrome de Cockayne no reparo de excisão de nucleotídeos acoplado à transcrição. *Mech. Ageing Dev.* 134, 196–201. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2013.03.008>.
- Santiago, S.P., Junior, H.L.R., de Sousa, J.C., de Paula Borges, D., de Oliveira, R.T.G., Farias, I.R., Costa, M.B., Maia, A.R.S., da Nobrega, I.M., Magalhães, S.M.M., Pinheiro, R.F., 2017. Novos polimorfismos dos genes de reparo de DNA do Xeroderma Pigmentosum na síndrome mielodisplásica. *Leuk. Res.* 58, 73–82. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2017.03.012>.
- Scharer, O.S., 2013. Nucleotide excision repair in eukaryotes (Reparo de excisão de nucleotídeos em eucariotos). Department of pharmacological sciences and department of chemistry, stony brook university, stony brook, New York 11974-3400. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 5, a012609 <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012609>.
- Schmittgen, T.D., Livak, K.J., 2008. Análise de dados de PCR em tempo real pelo método comparativo C (T). *Nat. Protoc.* 3 (6), 1101–1108. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>.
- Townsend, M., Peck, C., Meng, W., Heaton, M., Robison, R., O'Neill, K., 2017. Avaliação de várias concentrações de glifosato em danos ao DNA em células Raji humanas e seu impacto na citotoxicidade. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 85, 79–85. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2017.02.002>.
- USDA - As fazendas familiares são o foco dos novos dados do Censo Agrícola, 2015. Departamento de Agricultura dos Estados Unidos. Mar. Disponível em: <https://www.usda.gov/mediapress-releases/2015/03/17/family-farms-are-focus-new-agriculture-census-data>.
- Uziel, O., Yerushalmi, R., Zuriano, L., Naser, S., Beery, E., Nordenberg, J., Lubin, I., Adel, Y., Shepshelovich, D., Yavin, H., Ben Aharon, I., Pery, S., Rizel, S., Pasmanik-Chor, M., Frumkin, D., Lahav, M., 2016. As mutações BRCA1/2 perturbam a biologia dos telômeros: caracterização de anormalidades estruturais e funcionais in vitro e in vivo. *Oncotarget* 7 (3), 2433–2454. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5693>.
- Weeden, C.E., Asselin-Labat, M.-L., 2018. Mecanismos de reparo de danos ao DNA em células-tronco adultas e implicações para a formação de câncer. *BBA - Molecular Basis of Disease (Bases Moleculares da Doença)*. 1864, 89–101. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.10.015>.