



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

ADIL DE OLIVEIRA PACHECO

INSTABILIDADE CROMOSSÔMICA INDUZIDA POR AGROQUÍMICOS EM TRABALHADORES RURAIS DA REGIÃO DE PASSO FUNDO - RS

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo (a) candidato (a) Adil de Oliveira Pacheco e aprovada pela Comissão Julgadora. 12/09/00

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Biologia Celular e Estrutural na área de Biologia Celular.

Orientadora: Profa. Dra. Christine Hackel

7182000



UNIDADE _____
N.º CHAMADA: TI UNICAMP
P115i
V. _____ Ex. _____
TOMBO BC/ 40408
PROC. 278/2000
C D
PREÇO R\$ 11,00
DATA 17-02-00
N.º CPD _____

CM-00133166-1

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

Pacheco, Adil de Oliveira
P115i Instabilidade cromosômica induzida por agroquímicos em
trabalhadores rurais da região de Passo Fundo-RS/Adil de
Oliveira Pacheco. -- Campinas, SP:[s.n.], 2000.
66f. ilus.

Orientadora: Christine Hackel
Dissertação(mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

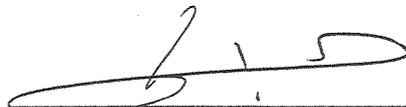
1. Cromossomos. 2. Agroquímica. 3. Micronúcleos. I. Hackel,
Christine. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.
III. Título.

LOCAL E DATA: 12/01/2000

BANCA EXAMINADORA

TITULARES:

Profa.Dra. Christine Hackel (Orientadora)



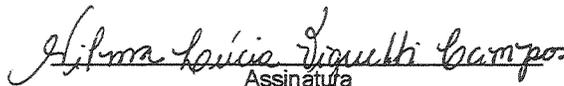
Assinatura

Profa.Dra. Mary Anne Heidi Dolder



Assinatura

Profa.Dra. Nilma Lúcia Viguetti Campos



Assinatura

SUPLENTE:

Profa.Dra. Maricilda Palandi de Mello

Assinatura

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese aos meus pais Lacy e Eunice, pelo exemplo de amor e carinho que sempre direcionou sua vidas.

A minha esposa Marta que juntos aceitamos este desafio que agora estamos chegando ao fim.

E a meus filhos Aline, Àlisson, Andrei e Vaniza pela sua compreensão em aceitar os momentos de minha ausência.

AGRADECIMENTOS

Ao finalizar mais uma etapa na busca do conhecimento, gostaria de agradecer as pessoas que colaboraram para que este sonho se tornasse realidade.

Profa. Dra. Christine Hackel que aceitou o desafio, pela disponibilidade, amizade e carinho demonstrado durante a realização do Mestrado.

À Diretora do Instituto de Ciências Biológicas Profa. Lorena Consalter Geib pela confiança em mim depositada.

À Coordenadora de Pesquisa do ICB Profa. Dra. Thais L. Codenotti pelo incentivo.

Aos Professores do Curso de Mestrado em Biologia Celular pelos conhecimentos transmitidos.

À Profa. MSc. Dileta Cecchetti pelo auxílio nos cálculos estatísticos.

Aos colegas de Mestrado pela amizade e a convivência durante a realização do curso.

Aos colegas e amigos Anita Moro, Cleber F. Marcolan e Edarci Michelin pelo auxílio nas coletas de sangue durante a realização deste trabalho.

À funcionária do Banco de Dados, Márcia da Silva Jorge pelo auxílio na montagem da tese.

SUMÁRIO

ABREVIATURAS	vii
LISTA DE FIGURAS E TABELAS	viii
RESUMO	x
SUMMARY	xi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Efeitos genotóxicos dos agroquímicos.....	5
1.1.1. Aberrações cromossômicas em culturas de linfócitos de sangue periférico	6
1.1.2. O teste do micronúcleo como indicador de instabilidade cromossômica	10
2. OBJETIVOS	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1. Casuística	15
3.2. Métodos	18
3.2.1. Coleta.....	18
3.2.2. Cultura de linfócitos de sangue periférico	18
3.2.3. Preparação das lâminas.....	19
3.2.4. Coloração.....	19
3.2.5. Análise das lâminas.....	19

3.2.6. Análise estatística.....	20
4. RESULTADOS.....	21
5. DISCUSSÃO	30
6. CONCLUSÕES.....	36
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37
8. ANEXOS.....	50
8.1. Ficha de coleta de dados – agricultor.....	50
8.2. Ficha de coleta de dados – controle.....	51
8.3. Consentimento pós-informação.....	52
8.4. Parecer da Comissão de Ética.....	55

ABREVIATURAS

CEPAGRO = Centro de Estudos Agropecuários da Universidade de Passo Fundo.

FISH = Fluorescence *in situ* hybridization

UPF = Universidade de Passo Fundo

HSVP = Hospital São Vicente de Paulo de Passo Fundo

MN = Micronúcleo

+ = Consumo de álcool e hábito de fumar

- = Não consumidor de álcool e não tem hábito de fumar

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figuras 1 e 2. Linfócitos binucleados corados com Giemsa-Wright com a presença de micronúcleos (MN) (Aumento:1200X).

Figura 3. Linfócito binucleado corado com Giemsa-Wright com citoplasma e dois núcleos bem evidentes (Aumento: 1200X).

Figura 4. Núcleos apoptóticos (Aumento: 1200X).

Figura 5. Possível perda ou atraso anafásico (→) em linfócitos binucleados corados com Giemsa-Wright (Aumento: 1200X).

Figura 6. Perdas cromossômicas (→) e ponte anafásica (pa) em linfócitos binucleados corados com Giemsa-Wright (Aumento: 1200X).

Tabela 1- Classificação dos tipos de praguicidas quanto ao princípio ativo, uso forma de absorção e alguns exemplos utilizados em plantações.

Tabela 2.- Dados referentes ao número de células binucleadas com micronúcleo, hábito de fumar, ingestão de álcool, idade, sexo e tempo de exposição a agroquímicos de trabalhadores expostos.

Tabela 3- Dados referentes ao número de células binucleadas com micronúcleos, hábito de fumar, ingestão de álcool, idade e sexo dos doadores voluntários do grupo controle.

Tabela 4- Resultados da comparação do número de células binucleadas com micronúcleos, relativos ao tempo de exposição, idade e tabagismo dos 30 trabalhadores expostos.

Tabela 5. Resultados da comparação do número de células binucleadas com micronúcleos, relativos a idade e tabagismo dos 30 doadores voluntários.

Tabela 6 – Resultados da comparação do número de células binucleadas com micronúcleos entre indivíduos expostos e não expostos, quanto a ausência ou presença de tabagismo.

RESUMO

A região de Passo Fundo no Planalto Médio do Rio Grande do Sul caracteriza-se pela produção de grãos (trigo, soja) e também hortigranjeiros. No combate as pragas destas culturas, os agricultores fazem uso de grandes quantidades de agroquímicos (fungicidas, inseticidas e herbicidas). Para testar a possível atividade genotóxica destes produtos, utilizou-se a técnica de micronúcleos, que consiste na identificação de pequenos núcleos visíveis em células binucleadas, resultantes da perda de parte ou de cromossomos inteiros pela célula, durante a divisão celular.

Para a análise dos micronúcleos, foram coletados 2 mL de sangue periférico heparinizado de trinta trabalhadores expostos, relacionados diretamente com a aplicação e manuseio destes produtos e trinta indivíduos não expostos. Dados relativos ao hábito de fumar, consumo de bebida alcoólica, sexo, idade e tempo de exposição foram também identificados. Culturas de linfócitos de sangue periférico foram tratadas com citocalasina B por um período de 24 horas antes de completar o tempo total de cultura. Após a contagem de 1000 células binucleadas a frequência de micronúcleos de ambos os grupos foi avaliada e aplicado o teste de "t" Student, indicando diferença altamente significativa entre expostos (14,4/1000) e não expostos (7,2/1000). Outros fatores relacionados com a instabilidade cromossômica como tabagismo, sexo, idade e tempo de exposição, não influenciaram de modo significativo em ambos os grupos.

Finalmente, podemos concluir que o teste do micronúcleo mostrou-se eficiente como ensaio biológico para monitorar populações expostas a misturas de agroquímicos.

SUMMARY

Much of grain cultivation (wheat and soybean) in the Rio Grande do Sul state is carried out in the region of Passo Fundo.

For crop pest control, great amounts of agrochemicals (fungicides, insecticides, herbicides) are used. To evaluate the genotoxicity of these products, the micronucleus test was applied in the study of rural workers directly exposed to these chemicals. The micronuclei are small nuclei resulting from the loss of whole chromosomes or acentric fragments during cell division, that can be identified in binucleated cells.

Heparinized blood samples were drawn by venepuncture from 30 exposed workers and 30 non-exposed controls. To perform micronuclei analysis on lymphocyte cultures , Cytochalasin B was added to block cytokinesis after 44h incubation at 37^o C, resulting in the formation of multinucleated cells.

Data about smoking and drinking habits, sex, age and exposure duration were also identified. Micronuclei frequency was evaluated by counting 1000 binucleated cells in both groups. Statistical analysis showed significantly higher mean number levels of binucleated cells with micronuclei in exposed individuals (14,4/1000) than in controls (7,2/1000). Other factors related to chromosome instability, such as smoking habits, age and exposure duration, showed no effect on the frequency of micronuclei in both groups.

Finally, we can conclude that the micronuclei test is an efficient biological assay for monitoring population exposure to mixtures of agrochemicals.

1 - INTRODUÇÃO

Durante o século XX, o processo de industrialização conduziu à introdução de exposições ambientais e ocupacionais a novos agentes, tais como o asbesto, praguicidas, cloreto de vinila e outros produtos químicos, sobretudo no México, Argentina, Brasil, Chile e Venezuela (KOIFMAN, 1998).

Este novo padrão de exposições, além do processo de envelhecimento da população, tem provavelmente contribuído para uma modificação no perfil da distribuição do câncer nas populações latino-americanas. Da mesma forma que em países em desenvolvimento localizados na África e na Ásia, onde são observadas altas taxas de câncer de estômago, cérvico-uterino e da cavidade oral, as populações latino-americanas têm vivenciado um aumento recente na incidência de câncer de mama, cólon, pulmão e próstata. Adicionalmente, o fenômeno de globalização econômica, facilitando a transferência de processos industriais danosos para os países em desenvolvimento, poderá vir a favorecer uma elevação da incidência de câncer nestas regiões em futuro próximo (KOIFMAN, 1998).

Apesar de todos os avanços tecnológicos obtidos nas últimas décadas, ainda hoje há grandes interrogações acerca dos agentes etiológicos determinantes da ocorrência da maioria dos tumores malignos. Os mecanismos que interferem no fenômeno da carcinogênese são alvo de inúmeros estudos em todo o mundo,

porém é inegável que fatores relacionados ao meio ambiente estão implicados na etiologia da maioria das neoplasias (PAGE & ASIRE, 1985).

Tendo em conta o crescimento industrial que sofreram os centros urbanos brasileiros nas últimas décadas, torna-se impossível a mensuração da magnitude que a deterioração do meio ambiente exerce sobre a saúde da humanidade. As taxas atuais de ocorrência de câncer refletem exposições ocorridas há vinte ou trinta anos, quando os níveis de produção de substâncias cancerígenas constituíam uma pequena fração das atuais, em quantidade e variedade. É previsível, assim, que as neoplasias malignas refletirão no futuro as conseqüências do aumento da produção de substâncias cancerígenas (LOPES *et al.*, 1992)

Avaliações preliminares no país indicam a existência de graus excessivos de exposição da população à agentes cancerígenos ocupacionais ou ambientais *latu sensu*, como, por exemplo, determinadas substâncias de uso industrial e agrícola, medicamentos, radiações ionizantes (¹FAERSTEIN *et al.*, 1988).

A existência de uma possível relação casual entre determinadas práticas agrícolas e o câncer tem sido objeto de atenção de vários pesquisadores, particularmente nos países mais ricos, especialmente depois que a agricultura moderna passou a utilizar, de maneira intensiva, fertilizantes, praguicidas, fungicidas, herbicidas e outros produtos químicos (Tabela 1), visando aumentar a produtividade (LOPES *et al.*, 1992).

¹FAERSTEIN *et al.*, 1988 *apud* Lopes *et al.*, 1992.

Tabela 1. Classificação dos tipos de praguicidas quanto ao princípio ativo, uso, forma de absorção e alguns exemplos utilizados em plantações.

Tipo	USO	VIA DE ABSORÇÃO	EXEMPLOS
Carbamatos	Inseticidas	Oral, respiratória e dérmica	Carbaril, Cartap, Ziram, Zineb, Thiram, Pirimicarb, Aldicarb
Organoclorados	Inseticidas Acaricidas Nematicidas Fungicidas	Oral, respiratória e dérmica	DDT, TDE, Aldrin, Dieldrin, BHC, Lindane, Endrin, Endossulfan Dicloropropano, Trimetiltin
Organofosforados	Inseticidas Acaricidas	Oral, respiratória e dérmica	Tricorfon, Fosmet, Diazinon, Malathion, Parathion, Dimetoato
Piretróides	Inseticidas Acaricidas	Oral, respiratória e dérmica	Aletrina, Cismetrina, Permetrina, Tetrametrina, Resmetrina
Compostos Clorofenóis	Herbicidas	Oral e respiratória	Ácido 2,4 Diclorofenóxiacético Ácido 2,4,5, Triclorofenóxiacético
Compostos Dipiridílicos	Herbicidas	Oral e respiratória	Paraquat e Diquat
Compostos Fumigantes	Nematicidas Inseticidas Fungicidas	Oral, respiratória e dérmica	Brometo de metila Fosfina
Dinítricos	Acaricida Fungicidas Herbicidas	Oral respiratória e dérmica	Binapacril, Dinobuton, Dinocap, Dinosebe, Flucoralin

Fontes : ZAMBRONE, 1986 e GELMINI & NOVO, 1987

Vários estudos epidemiológicos têm evidenciado que a exposição ocupacional a muitos praguicidas pode estar relacionada a diversos tipos de câncer (IARC, 1991). Em particular, foram detectados aumentos significativos para o risco de leucemias e mielomas múltiplos, para cânceres de estômago, fígado, pâncreas e bexiga, associados com exposição à praguicidas (revisão em CARBONELL *et al.* , 1995).

A hipótese biológica relacionando organoclorados ao câncer de mama está fortemente baseada em sua persistência como contaminante ambiental, o que já tinha sido identificado em peixes, tecidos humanos, sangue e leite, e em sua atividade estrogênica. A exposição humana a estes compostos acontece em geral por meio dos alimentos contaminados, em especial de produtos de origem animal. Estas substâncias acumulam-se em tecidos adiposos e persistem por décadas, sendo lentamente excretados através das fezes, urina e lactação (ROGAN *et al.*, 1986).

Segundo FORGET (1991) os defensivos agrícolas desempenham um papel importante no controle de pragas, patógenos e ervas daninhas na agricultura. Mais de 15.000 compostos individuais e 35.000 formulações começaram a ser usadas desde 1945 e, atualmente eles representam uma parcela relevante de substâncias químicas para as quais o ser humano está exposto. A grande quantidade de ingredientes agroquímicos usados têm induzido efeitos tóxicos agudos em diferentes sistemas experimentais. Efeitos genotóxicos também têm sido relatados para muitos compostos, incluindo carbamatos, organofosforados e hidrocarbonetos clorinados. Outro fato importante é que o risco genético em potencial decorrente da exposição a longo prazo aos praguicidas em seres humanos não tem sido extensivamente estudado (BOLOGNESI *et al.*, 1993).

Trabalhadores rurais dos países em desenvolvimento estão particularmente expostos ao alto risco de doenças relacionadas com os praguicidas. Nestes países, como regra, agroquímicos são descuidadamente manuseados e o equipamento de proteção pessoal, bem como roupa adequada raramente são usadas pelos trabalhadores encarregados da mistura, do acondicionamento e da pulverização (FORGET, 1991; JEYARATNAM, 1993).

Contudo, a falta de interesse governamental e público, ausência de regulamentação severa, baixo padrão de vida, educação pobre, e analfabetismo em áreas rurais são fatores que contribuem para fazer da exposição ocupacional a praguicidas um dos principais problemas de saúde pública em países pouco desenvolvidos (PAUMGARTTEN *et al.*, 1998).

1.1. Efeitos genotóxicos dos agroquímicos

Muitos praguicidas têm sido testados para genotoxicidade por intermédio de uma variedade de experimentos *in vitro* e *in vivo*. Compostos mutagênicos tem sido encontrados em todas as principais categorias de praguicidas, incluindo fungicidas, inseticidas e herbicidas (DE FERRARI *et al.*, 1991). De modo semelhante, os estudos citogenéticos vem sendo amplamente utilizados em testes *in vitro* e no biomonitoramento de populações ocupacionalmente expostas.

1.1.1. Aberrações cromossômicas em culturas de linfócitos de sangue periférico

YUNIS, (1983) e ROWLEY, (1984) verificaram que aberrações cromossômicas não casuais, principalmente deleções, translocações e o ganho ou perda de cromossomos inteiros estão associados com uma variedade de cânceres humanos, incluindo leucemias. Supõe-se que muitas destas mudanças são eventos primários críticos para o surgimento de neoplasias (KLEIN, 1981; CAVANEE *et al.*, 1983; TSUTSUI *et al.*, 1983). Dessa forma, agentes genotóxicos capazes de induzir instabilidade cromossômica, podem contribuir para o desenvolvimento de processos celulares malignos.

Segundo RABELLO-GAY *et al.*, 1991, os ensaios biológicos desenvolvidos em culturas de células de mamíferos permitem identificar substâncias que produzem aberrações cromossômicas estruturais -efeito clastogênico – e substâncias que interferem no fuso acromático, alterando a distribuição dos cromossomos durante a divisão celular – efeito aneugênico. Além disso, outros testes, tais como a investigação do intercâmbio entre cromátides irmãs, podem ser utilizados para estimar o potencial mutagênico dessas substâncias (VARELLA-GARCIA, 1991). Esses ensaios têm sido utilizados para avaliar o potencial genotóxico da exposição a vários agentes do meio ambiente, dentre os quais os agroquímicos.

Quanto à investigação citogenética envolvendo trabalhadores das indústrias de praguicidas e trabalhadores rurais, existem relativamente poucos dados na literatura quando comparado ao grande número de resultados relativos a outros poluentes químicos (PÁLDY *et al.*, 1987).

Com relação aos contatos profissionais com diferentes grupos de praguicidas, existem resultados demonstrando uma forte associação entre alterações cromossômicas e exposição ocupacional aos di-tio-carbamatos (Ziram, Zineb, Thiram), aos organofosforados (Tricorfon, Fosmet, Diazinon) e aos carbamatos (Pirimicarb), em trabalhadores rurais e das respectivas indústrias (revisão em PÁLDY *et al.*, 1987)

A análise do efeito clastogênico de praguicidas organoclorados mostrou uma relação dose-resposta entre as aberrações cromossômicas e o nível de DDT no plasma (RABELLO *et al.*, 1975), mas nenhum aumento apreciável foi observado em trabalhadores com Lindane (KIRÁLY *et al.*, 1979). O Dicloropropano, com relação a efeito clastogênico, também forneceu resultados negativos (KAPP *et al.*, 1979). De modo semelhante, o contato com um tipo de fungicida heterocíclico (Benomil) não causou um aumento significativo na taxa de aberrações cromossômicas (¹RUZUICKSKA *et al.*, 1976). Uma combinação de ácido fenolacético e triazina (Clorinol e Buvinol) também mostrou resultados negativos na análise cromossômica (CZEIZEL *et al.*, 1976).

Por outro lado, BALAJI & SASIKALA (1993) encontraram um aumento na frequência de aberrações cromossômicas bem como no intercâmbio de cromátides irmãs, em cultura de linfócitos de sangue periférico quando tratados com diferentes doses de Malathion.

¹RUZUICKSKA *et al.*, 1976 *apud* PÁLDY *et al.*, 1987

A grande maioria das observações realizadas com indivíduos que tiveram contato profissional com misturas de praguicidas mostrou aberrações nos cromossomos (YODER *et al.*,1973; CROSSEN *et al.*,1978; GEORGIEVA, 1977; SHABTAI *et al.*,1979; VOLJANSKAYA & VASILOS, 1981; NEHÈZ *et al.*,1981; ¹PILINSKAYA, 1977, 1979, 1982 a,b). Análises citogenéticas a partir de linfócitos de sangue periférico de pacientes com intoxicações agudas por praguicidas foram positivas em todos os casos revistos por LARRIPA *et al.*, 1983.

DESI *et al.* (1990) descreveram um aumento na frequência de células hipodiplóides em linfócitos de sangue periférico cultivados *in vitro* de trabalhadores expostos ocupacionalmente a praguicidas.

A avaliação a respeito de aberrações cromossômicas e intercâmbio de cromátides irmãs foi realizada por DE FERRARI *et al.* (1991) em linfócitos de 32 indivíduos sadios trabalhadores da indústria de flores, 32 expostos e hospitalizados com câncer de bexiga, e 31 controles. Os resultados apontaram para um aumento significativo na incidência de aberrações cromossômicas e do intercâmbio entre cromátides irmãs em ambos os grupos, comparados a indivíduos não expostos.

¹PILINSKAYA, 1977, 1979, 1982 a,b *apud* PÁLDY *et al.*, 1987

A freqüência de aberrações cromossômicas foi estudada por KOURAKIS *et al.* (1992) em linfócitos de sangue periférico de 29 trabalhadores ocupacionalmente expostos a uma mistura de pesticidas em casas de vegetação. Encontraram um aumento significativo de aberrações cromossômicas em aplicadores em relação aos não expostos. Nenhuma correlação positiva foi identificada entre a freqüência de aberrações cromossômicas e o tempo de exposição, do mesmo modo, não houve significância na comparação de indivíduos fumantes e não fumantes.

O efeito tóxico pela exposição a praguicidas depende das características químicas, tipo, número e freqüência de aplicações dos agroquímicos, níveis de exposição, uso de medidas de proteção, fatores genéticos e estilo de vida (KURTZ *et al.*, 1989). Na Espanha, CARBONELL *et al.* (1995) constataram variações sazonais na freqüência de aberrações cromossômicas em linfócitos de agricultores expostos a diversos pesticidas. No período de maior exposição (primavera-verão), a freqüência de quebras, especialmente do tipo cromatídico, achou-se significativamente aumentada em relação à observada no período de menor exposição (outono-inverno). Segundo esses autores, tais achados indicam que a freqüência de aberrações cromossômicas está relacionada com a intensidade da exposição e que as quebras cromatídicas tem uma vida curta, retornando a valores normais após alguns meses.

Em trabalho recentemente realizado com trabalhadores rurais expostos a praguicidas, da região de Botucatu, SP, BRÉGA *et al.* (1998) verificaram freqüências de aberrações numéricas e estruturais significativamente mais elevadas no grupo exposto quando comparado ao grupo controle. Esses autores constataram ainda a presença de vários sintomas clínicos nos trabalhadores expostos, apesar de os mesmos usarem vestimentas protetoras adequadas.

1.1.2. O teste do micronúcleo como indicador de instabilidade cromossômica.

A presença de micronúcleos em células somáticas é indicativo de quebras cromossômicas e distúrbios no fuso acromático. Os micronúcleos são detectados em células interfásicas como pequenas partículas de cromatina, próximas aos núcleos principais (MIGLIORE *et al.*, 1991).

A pesquisa citoplasmática, vastamente aplicada à eritrócitos policromáticos de roedores (SCHMID, 1975) tem sido proposta para avaliar a exposição humana à mutagênicos em células de aspirado de medula (HÖGSTEDT *et al.*, 1983), em células da mucosa bucal (STICH *et al.*, 1982), em células uroteliais esfoliadas (REALI *et al.*, 1987), e em linfócitos de sangue periférico (COUNTRYMAN & HEDDLE, 1976).

A partir de dados publicados sobre a análise de micronúcleos monitorando grupos de indivíduos ocupacionalmente expostos (HÖGSTEDT *et al.*, 1981, 1983; STENSTRAND, 1985; MÄKI-PAKKANEN, 1987; SORSA *et al.*, 1988; SARTO *et al.*, 1990), tornou-se claro que esta técnica é evidentemente mais fácil de executar que os ensaios citogenéticos tradicionais (análise cromossômica e intercâmbio entre cromátides irmãs). Nessa técnica, em células cultivadas *in vitro*, utiliza-se a citocalasina B para inibir a citocinese resultando na formação de células bi ou multinucleadas as quais podem ser contadas com relação a presença ou ausência de micronúcleos (FENECH & MORLEY, 1985).

Em relação à sua sensibilidade, alguns estudos de comparação do teste de micronúcleo com os outros métodos citogenéticos clássicos, mostram que a análise de micronúcleos é menos sensível quando comparada com as outras técnicas (HÖGSTEDT *et al.*, 1983). A maior vantagem da análise de metáfases consiste na identificação de alterações numéricas e de rearranjos estruturais, tais como deleções e translocações dos cromossomos. Entretanto, do ponto de vista de monitoramento do efeito genotóxico, é importante lembrar que as quebras cromatídicas ou cromossômicas são as lesões mais precocemente induzidas pela maioria dos agentes clastogênicos. Desse modo, sua detecção pelo teste de micronúcleo é suficiente para o monitoramento desse efeito (HÖGSTEDT *et al.*, 1984).

De acordo com HEDDLE *et al.* (1991) a formação de micronúcleos a partir de fragmentos de cromossomos acêntricos é ampla e facilmente entendida, e podemos usá-la para destacar algumas dúvidas que ainda restam. Existem, de fato, quatro mecanismos reconhecidos pelos quais micronúcleos e estruturas semelhantes podem se originar: (1) perda de fragmentos mitóticos acêntricos, mecanismo clássico, (2) uma variedade de conseqüências mecânicas de quebras e trocas cromossômicas, (3) perdas mitóticas de cromossomos inteiros, e (4) apoptose. O último é uma forma de destruição nuclear na qual são formados núcleos desintegrados e fragmentos nucleares. A apoptose ocorre naturalmente e em resposta a danos celulares quimicamente induzidos, os quais não necessariamente são de origem genética: inibição da síntese de proteínas é um exemplo.

A relação quantitativa entre a freqüência de aberrações cromossômicas e fragmentos acêntricos não é bem conhecida, exceto que nem todos os fragmentos acêntricos tornam-se micronúcleos na primeira divisão celular e que alguns podem

sobreviver, replicar, e tornarem-se micronúcleos na segunda ou em divisões subseqüentes. A eficiência na perda de fragmentos e formação de micronúcleos presumivelmente varia de uma célula para outra, dependendo das propriedades mecânicas da célula, tais como tamanho e forma, bem como tamanho e forma dos cromossomos (HEDDLE *et al.*, 1991).

Na meiose, segundo HEDDLE *et al.* (1991) também podem surgir micronúcleos a partir de conseqüências mecânicas de aberrações cromossômicas. Neste tipo de divisão celular deve ser considerado também o efeito dos quiasmas. Por exemplo, um quiasma dentro de uma inversão paracêntrica gerará um fragmento acêntrico o qual poderá formar um micronúcleo.

De acordo com HEDDLE *et al.* (1991), todas as substâncias clastogênicas produziram micronúcleos, contudo nem todas as substâncias químicas que induzem micronúcleos são clastogênicas porque estes podem surgir por falta de disjunção ou apoptose. Os micronúcleos induzidos por clastógenos podem ser diferenciados morfológicamente daqueles induzidos por substâncias aneugênicas, porque os primeiros são menores e a presença de proteínas associadas ao centrômero, detectadas por anticorpos anti-cinetócoro, ocorre preferencialmente nos micronúcleos maiores.

As análises de micronúcleos em linfócitos humanos e em linhagens de células cultivadas mostraram ser efetivas também para medir danos citogenéticos de agentes com diferentes mecanismos de genotoxicidade *in vitro* (FENECH & MORLEY, 1985; EASTMOND & TUCKER, 1989; NORPPA *et al.*, 1993a). A principal vantagem da análise de micronúcleos para estudos de populações é que ela é menos dispendiosa e consome menor tempo do que em outras análises citogenéticas. Estas pesquisas têm sido aplicadas em várias atividades

ocupacionais. Freqüências aumentadas de micronúcleos foram encontradas como resultado da exposição à drogas citotóxicas (YAGER *et al.*, 1988) e tolueno (NISE *et al.*, 1991), enquanto resultados de estudos de populações expostas a formaldeído e outros agentes químicos foram negativos em linfócitos humanos (NORPPA *et al.*, 1993 b; TITENCKO-HOLLAND *et al.*, 1995).

GHOSH *et al.* (1990) avaliaram o efeito citogenético de um biocida organoclorado (Trimetiltin clorídrico) *in vitro* por intermédio da contagem de micronúcleos em linfócitos humanos e sugerem que esta substância é um potente clastógeno bem como um inibidor do mecanismo das fibras do fuso acromático. SURRALLÉS *et al.* (1995) estudando a indução de micronúcleos por cinco inseticidas piretróides em culturas de sangue total e linfócitos humanos isolados, notaram claro efeito citotóxico dose-dependente. Observaram também atividade genotóxica *in vitro*, dependendo do piretróide usado.

PANNEERSELVAM *et al.* (1995) cultivaram linfócitos humanos expostos a três diferentes concentrações de um herbicida, o Flucoralin, e concluíram que baixas concentrações deste produto (2,5 a 10 µg/mL) não produzem freqüências significativas de micronúcleos, porém em doses mais altas (20,0 a 50,0 µg/mL) houve um aumento significativo no número de células micronucleadas.

TITENCKO-HOLLAND *et al.* (1997) tiveram sua atenção despertada para o uso de Malathion, aplicado por via aérea, e pesquisaram 38 voluntários, aplicadores desse inseticida na Califórnia. Esses autores avaliaram a indução de micronúcleos em linfócitos de sangue total e linfócitos isolados em Ficoll, e usando tratamento de 48 h com doses de 5 a 100 microgramas/mL de Malathion, concluíram que esse produto tem baixo potencial para causar danos cromossômicos *in vitro* e *in vivo*. Entretanto, esses autores consideravam que

estudos adicionais devam ser realizados a fim de investigar a possibilidade de interação do Malathion com outros pesticidas em exposição combinada.

Na Itália, BOLOGNESI et al. (1993) avaliaram a freqüência de micronúcleos em 71 produtores de flores expostos a pesticidas e 75 moradores da mesma região não expostos que serviram como controle, encontraram um aumento significativo na freqüência de micronúcleos nos indivíduos ocupacionalmente expostos. Por outro lado, SCARPATO et al. (1996) relatam a ausência de diferenças significativas nas incidências de aberrações estruturais dos cromossomos, intercâmbio de segmentos entre cromátides-irmãs e de micronúcleos em floricultores italianos expostos a uma mistura de pesticidas.

Para SCARPATO et al. (1996) resultados conflitantes do monitoramento citogenético das populações expostas a agroquímicos podem ser atribuídos a múltiplos e diferentes tipos de exposição ou à composição heterogênea dos vários estudos de populações, aliadas aos diferentes graus de sensibilidade das análises citogenéticas.

A progressiva conscientização da população humana da exposição a diversos fatores ambientais bem como a efluentes industriais, tem levado a mais e mais estudos sobre os efeitos *in vivo* e *in vitro* de substâncias químicas orgânicas e inorgânicas (BERG, 1979; SORSA et al., 1983; VAINIO, 1985).

A região de Passo Fundo-RS, caracteriza-se por extensas áreas de agricultura, destacando-se entre elas as culturas de soja e trigo. Por se tratar de monoculturas, faz-se necessário a utilização de grandes quantidades de defensivos agrícolas.

No presente trabalho, utilizou-se a técnica de micronúcleos para avaliar o risco potencial de danos cromossômicos em trabalhadores expostos aos diversos agroquímicos aplicados ao controle de pragas nessas culturas.

2 - OBJETIVOS

Avaliar o efeito da exposição ocupacional aos defensivos agrícolas na região de Passo Fundo – RS, em linfócitos de sangue periférico de trabalhadores rurais, pelo teste de micronúcleos.

Relacionar a ocorrência de micronúcleos ao tempo de exposição, hábito de fumar, sexo, idade e consumo de álcool, como possíveis potencializadores da ação dos defensivos agrícolas, entre os expostos e não expostos ocupacionais.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Casuística

Foram coletadas amostras de sangue periférico de 30 indivíduos expostos a agroquímicos , no período de setembro de 1998 a agosto de 1999.

As amostras foram obtidas no Hospital São Vicente de Paulo (HSVP) de Passo Fundo e no Centro de Estudos Agropecuários (CEPAGRO) da Universidade de Passo Fundo (UPF). No Hospital, foram coletadas amostras de 20 indivíduos internados para a investigação de doenças hematológicas, antes da administração de qualquer medicamento. No CEPAGRO, outros 10 doadores, sem queixas clínicas, submeteram-se a coleta.

Todos os indivíduos preencheram uma ficha contendo dados de identificação, hábito de fumar, ingestão de bebida alcoólica e tempo de exposição a defensivos agrícolas (Anexo 1). Ao mesmo tempo, foi assinado o protocolo de Consentimento Pós-informação (Anexo 2), ficando uma cópia com o pesquisador e outra com o doador.

Os indivíduos expostos estão envolvidos em cultivo de soja e trigo e regularmente entram em contato com fungicidas, inseticidas e herbicidas. Como

grupo controle, foram analisados 30 indivíduos não expostos para os quais seguiram-se os mesmos procedimentos de coleta e entrevista dos indivíduos expostos. Desse grupo, todos eram funcionários dos setores administrativos da Universidade de Passo Fundo – RS. Todos os indivíduos estudados (expostos e controles) eram de origem caucasóide.

3.2. Métodos

3.2.1. Coleta

De cada indivíduo foi coletado 2 mL de sangue heparinizado em seringas descartáveis e transportado imediatamente, em caixa de isopor com gelo, para o Laboratório de Citogenética Humana da UPF. Em paralelo, selecionou-se um indivíduo não exposto de mesma idade ou dentro de uma variação de ± 5 anos, para controle.

3.2.2. Cultura temporária de linfócitos de sangue periférico

As culturas foram realizadas por intermédio da adição de 0,2 mL de sangue total a 4,5 mL de meio de cultura RPMI 1640 (Nutricell), suplementado com 15% de soro fetal bovino; 0,1 mL de L-glutamina (Nutricell) e 0,1 mL de Fitohemaglutinina, de acordo com TITENKO-HOLLAND *et al.* (1997), por 72 horas.

Após 48 horas de incubação foram adicionados 0,2 mL de Citocalasina B para cada 5 mL de meio, para impedir a citocinese. Ao completar 72 horas, a cultura foi interrompida com 0,5 mL de fixador metanol-ácido acético (3:1) durante

5 minutos à temperatura ambiente. Foi então centrifugado a 800 rpm e o sobrenadante descartado. Ao material foi adicionado 5 mL de fixador, agitado e novamente centrifugado. Este procedimento foi repetido 3 a 4 vezes, até o precipitado ficar limpo.

3.2.3. Preparação das lâminas

O precipitado obtido após as centrifugações, foi gotejado em lâminas limpas, 3 a 4 gotas em cada uma e deixado secar à temperatura ambiente durante 24 horas.

3.2.4. Coloração

As lâminas foram coradas com Giemsa segundo Wright, na concentração de 1:3 em tampão fosfato pH 6,8 durante 5 a 8 minutos.

3.2.5. Análise das lâminas

As lâminas foram codificadas por outro pesquisador. As análises foram realizadas em Fotomicroscópio Olympus (BX 50). Para cada indivíduo foram contadas 1000 linfócitos binucleados em teste-cego. Para a contagem de micronúcleos, foram consideradas apenas células que contivessem nenhum ou um micronúcleo.

Para a análise dos micronúcleos foram utilizados os critérios propostos por TITENKO-HOLLAND *et al.* (1997): (1) as células devem apresentar aparência redonda ou oval com citoplasma intacto; (2) os núcleos, tais como as células, também devem ser redondos ou ovais com a membrana nuclear intacta; (3)

somente as células que sofreram uma divisão nuclear devem ser analisadas em relação à presença de micronúcleos; (4) a presença de micronúcleo deve ser considerada quando este apresentar um terço ou menos do tamanho do núcleo principal; (5) os micronúcleos devem apresentar coloração similar a do núcleo principal; (6) os micronúcleos devem estar claramente separados do núcleo principal.

3.2.6. Análise Estatística

Para a comparação dos números de células binucleadas com micronúcleos entre os grupos exposto e não exposto, utilizou-se o teste *t* para duas amostras independentes adotando-se o nível de significância de 0,05. Este teste também foi aplicado para a comparação do número de micronúcleos entre fumantes e não fumantes, consumo ou não de álcool, idade, sexo e tempo de exposição.

Além disso, com intuito de avaliar a influência da idade e do tempo de exposição sobre a variável dependente, representada pelo número de células binucleadas com micronúcleo, realizou-se o teste de regressão linear com o auxílio do programa BIOESTAT (AYRES & AYRES, 1998). O mesmo teste foi aplicado para a avaliação do efeito da idade sobre a presença de micronúcleos no grupo não exposto.

4 - RESULTADOS

O efeito clastogênico dos agroquímicos sobre as células somáticas humanas de indivíduos expostos a estes produtos, foi avaliado por intermédio da análise de micronúcleos em linfócitos de sangue periférico. Os resultados obtidos a partir da contagem de 1000 células binucleadas de cada indivíduo encontram-se expressos na Tabela 2. Os resultados referentes à contagem de micronúcleos nos indivíduos do grupo controle estão listados na Tabela 3.

Nos doadores expostos, a média de idade foi 41,8 anos, enquanto que no grupo controle, a média foi de 40,4 anos. O tempo médio de exposição aos praguicidas foi de 10,7 anos. Entre os fumantes, somente o indivíduo identificado pelo número 13 na Tabela 2 relatou ter fumado mais de 35 anos, os demais tiveram uma exposição menor a este componente e haviam deixado o hábito há mais de três anos.

Uma vez que as amostras dos trabalhadores expostos foram coletadas em dois locais diferentes (HSPV e CEPAGRO), os dados referentes à análise de micronúcleos dos 20 indivíduos internados foram comparados com os obtidos dos 10 indivíduos expostos, sem sintomatologia clínica. Não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas entre eles ($t_{\text{calc}} = 1,3682$; 28 G.L., $p = 0,1821$), de forma que esses dados foram agrupados para as análises subsequentemente realizadas.

Com o auxílio do teste t , foram comparados os números de células binucleadas com micronúcleos (MN) entre trabalhadores expostos e doadores não expostos. O número médio de células MN encontrado no grupo dos trabalhadores expostos foi de 14,3, sendo de 7,1 no grupo dos doadores não expostos. Essa diferença foi estatisticamente significativa ($t_{\text{calc.}} = 4,2855$; 58 G.L., $p < 0,0001$).

Tabela 2. Dados referentes ao número de células binucleadas com micronúcleos (MN), hábito de fumar, ingestão de álcool, idade, sexo e tempo de exposição a agroquímicos de trabalhadores expostos.

Indivíduo (*)	MN / 1000 linfócitos binucleados	Fumo	Álcool	Idade (anos)	Tempo de exposição (anos)	Sexo
01	17	-	-	29	04	Masc.
02	20	-	-	39	10	Masc.
03	16	-	-	30	05	Masc.
04	14	-	-	25	07	Masc.
05	11	-	-	27	05	Masc.
06	06	+	-	47	04	Masc.
07	16	-	-	40	10	Masc.
08	19	-	-	44	12	Masc.
09	27	-	-	39	20	Masc.
10	23	+	-	37	10	Masc.
11	07	-	-	29	15	Masc.
12	15	-	-	24	05	Fem.
13	24	+	-	54	45	Masc.
14	14	-	-	70	02	Fem.
15	20	+	-	47	07	Masc.
16	06	+	-	66	02	Masc.
17	05	-	-	50	02	Masc.
18	08	+	-	52	03	Masc.
19	02	-	-	33	15	Masc.
20	11	+	-	58	10	Masc.
21	04	-	-	50	30	Masc.
22	09	-	-	37	10	Masc.
23	03	-	-	43	25	Masc.
24	19	-	-	33	08	Masc.
25	19	-	-	39	08	Masc.
26	12	-	-	24	11	Masc.
27	28	-	-	67	15	Masc.
28	24	+	-	45	03	Fem.
29	23	-	-	27	15	Masc.
30	06	-	-	49	04	Masc.

(-) não fumante e não ingere álcool (+) fumante e ingestão de álcool

(*) - 1 a 10 , amostras coletadas no CEPAGRO.

(*) - 11 a 30 , amostras coletadas no HSVP.

Tabela 3. Dados referentes ao número de células binucleadas com micronúcleos (MN), hábito de fumar, ingestão de álcool, idade e sexo dos doadores voluntários do grupo controle.

Doador	MN / 1000 linfócitos binucleados	Fumo	Álcool	Idade (anos)	Sexo
01	08	-	+	30	Masc.
02	10	-	-	38	Masc.
03	04	-	-	33	Masc.
04	02	-	-	25	Masc.
05	01	-	-	27	Masc.
06	07	-	-	46	Masc.
07	05	-	-	40	Masc.
08	06	+	-	43	Masc.
09	11	-	-	38	Masc.
10	02	-	-	34	Masc.
11	03	-	-	28	Masc.
12	12	-	-	23	Fem.
13	10	+	-	50	Masc.
14	15	-	-	62	Fem.
15	07	-	-	40	Masc.
16	03	-	-	63	Masc.
17	02	-	-	50	Masc.
18	03	-	-	53	Masc.
19	13	-	-	33	Masc.
20	06	-	-	58	Masc.
21	06	+	-	52	Masc.
22	01	-	-	38	Masc.
23	18	-	-	38	Masc.
24	04	+	-	29	Masc.
25	02	-	-	39	Masc.
26	08	-	-	24	Masc.
27	19	-	-	62	Masc.
28	17	-	-	46	Fem.
29	03	-	-	26	Masc.
30	04	-	-	44	Masc.

(-) não fumante e não ingere álcool

(+) fumante e ingestão de álcool

Também foram analisados os dados relativos ao tempo de exposição, idade e tabagismo em cada grupo. Os resultados dessa análise estatística acham-se representados nas Tabelas 4 e 5. Pôde-se verificar que não houve uma diferença estatisticamente significativa em relação ao tempo de exposição, quando foram comparados indivíduos expostos por até cinco anos com aqueles expostos por mais de cinco anos. De modo semelhante, a comparação do número de células binucleadas com micronúcleos, quando ambos os grupos foram separados em duas faixas etárias (até 39 anos e com 40 anos ou mais), ou divididos em tabagistas e não tabagistas, não revelou diferenças estatisticamente significativas em qualquer situação.

A análise de regressão linear permitiu confirmar esses achados, em relação à idade e ao tempo de exposição. Nos indivíduos expostos, não houve influência significativa da idade ($F= 0,0311$; $p= 0,8554$; $r= - 0,0195$) ou dos anos de exposição ($F= 0,5510$; $p= 0,5295$; $r= 0,1124$) sobre o número de células binucleadas com micronúcleos. A variável idade também não exerceu influência sobre a expressão de micronúcleos no grupo de doadores não expostos ($F= 1,9460$; $p= 0,1709$; $r= 0,1144$).

A influência das variáveis sexo e ingestão de álcool não pode ser estatisticamente avaliada tendo em vista o pequeno número de indivíduos de sexo feminino e a presença de apenas um indivíduo no grupo controle com relato de consumo freqüente de bebidas alcoólicas.

Tabela 4. Resultados da comparação do número de células binucleadas com micronúcleos (MN), relativos ao tempo de exposição, idade e tabagismo dos 30 trabalhadores expostos.

Variável		n	Média MN	t_{calc}^*	p
Tempo de exposição	Até 5 anos	11	11,63	- 1.4483	0,1505
	Mais de 5 anos	19	15,78		
Idade	Até 39 anos	15	15,60	0,9641	0,3432
	40 ou mais	15	12,93		
Fumo	Tabagistas	8	15,25	-0,4231	0,6753
	Não tabagistas	22	13,90		

n = número de indivíduos * G.L. = 28

Tabela 5. Resultados da comparação do número de células binucleadas com micronúcleos (MN), relativos a idade e tabagismo dos 30 doadores voluntários.

Variável		n	Média MN	t_{calc}^*	p
Idade	Até 39 anos	16	6,38	-0,7676	0,4491
	40 ou mais	14	7,86		
Fumo	Tabagistas	4	6,50	0,2285	0,8208
	Não tabagistas	26	7,15		

n = número de indivíduos * G.L. = 28

A comparação entre não fumantes expostos e controles revelou a existência de um aumento estatisticamente significativo do número de células MN no primeiro grupo (Tabela 6). Já entre fumantes expostos e não expostos, não houve diferença estatisticamente significativa ao nível de 5%, provavelmente devido ao pequeno número de indivíduos em cada categoria.

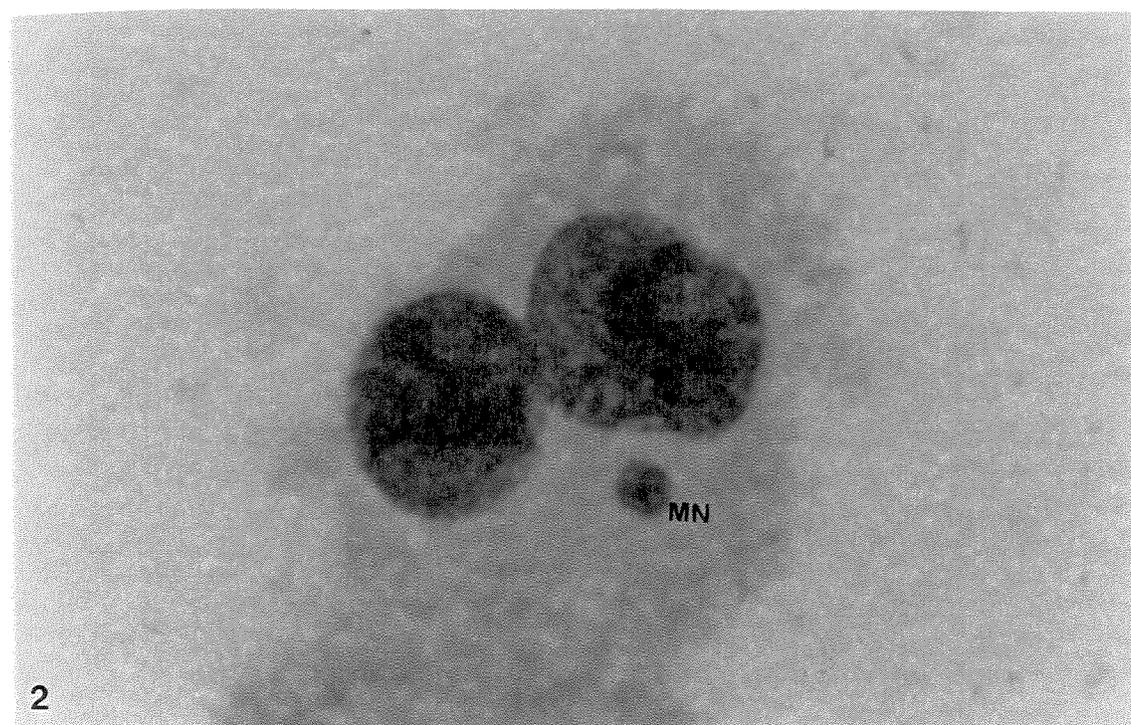
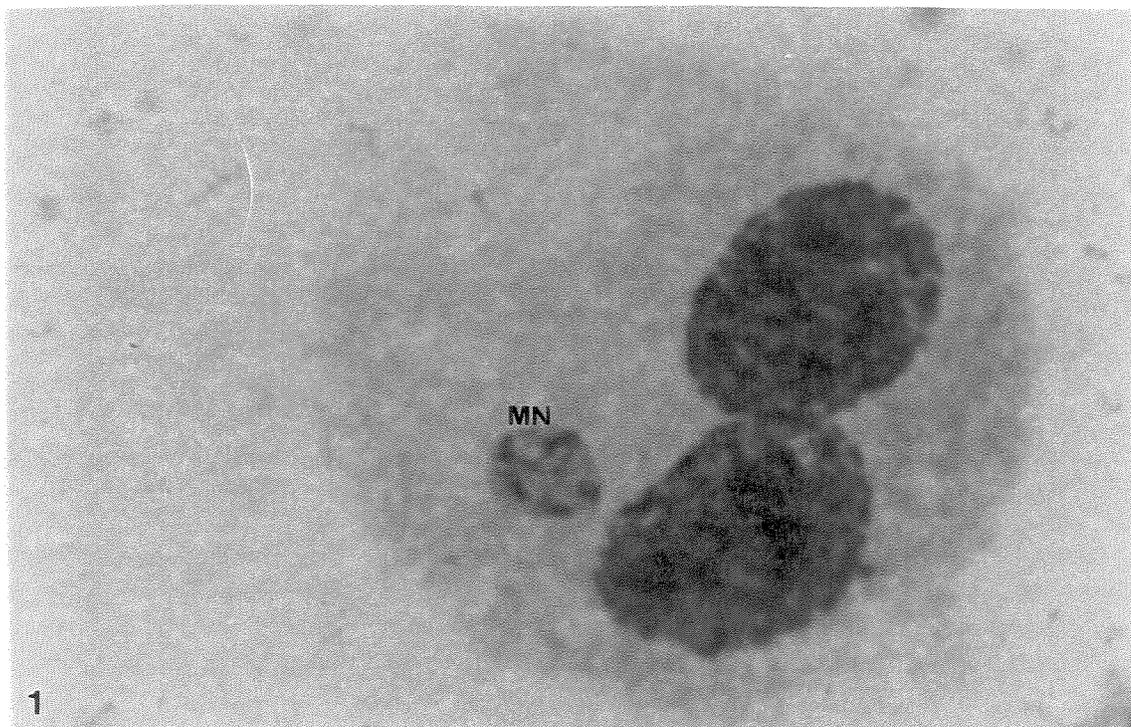
Tabela 6. Resultados da comparação do número de células binucleadas com micronúcleos (MN) entre indivíduos expostos e não expostos, quanto à ausência ou presença de tabagismo.

Variável		n	Média	t _{calc}	p
Tabagistas	Expostos	8	15,25	2,0278 G.L = 10	0,0701
	Não expostos	4	6,50		
Não tabagistas	Expostos	22	13,91	3,5842 G.L. = 46	0,0008
	Não expostos	26	7,15		

n = número de indivíduos

A seguir, encontram-se algumas ilustrações de diferentes aspectos citológicos observados no presente trabalho. As Figuras 1 e 2 ilustram a presença de micronúcleos de diferentes tamanhos; enquanto que na Figura 3 acha-se um linfócito binucleado sem micronúcleo.

Na Figura 4, podem ser visualizados núcleos apoptóticos e, nas Figuras 5 e 6, fenômenos de atraso anafásico que conduzem à perdas cromossômicas e formação de ponte anafásica. Embora estes últimos achados não tenham sido quantificados, a sua observação aponta para a existência de diferentes mecanismos de formação de micronúcleos.



Figuras 1 e 2 . Linfócitos binucleados corados com Giemsa – Wright. Notar em ambas, a presença de micronúcleos (MN) (Aumento: 1200 X).

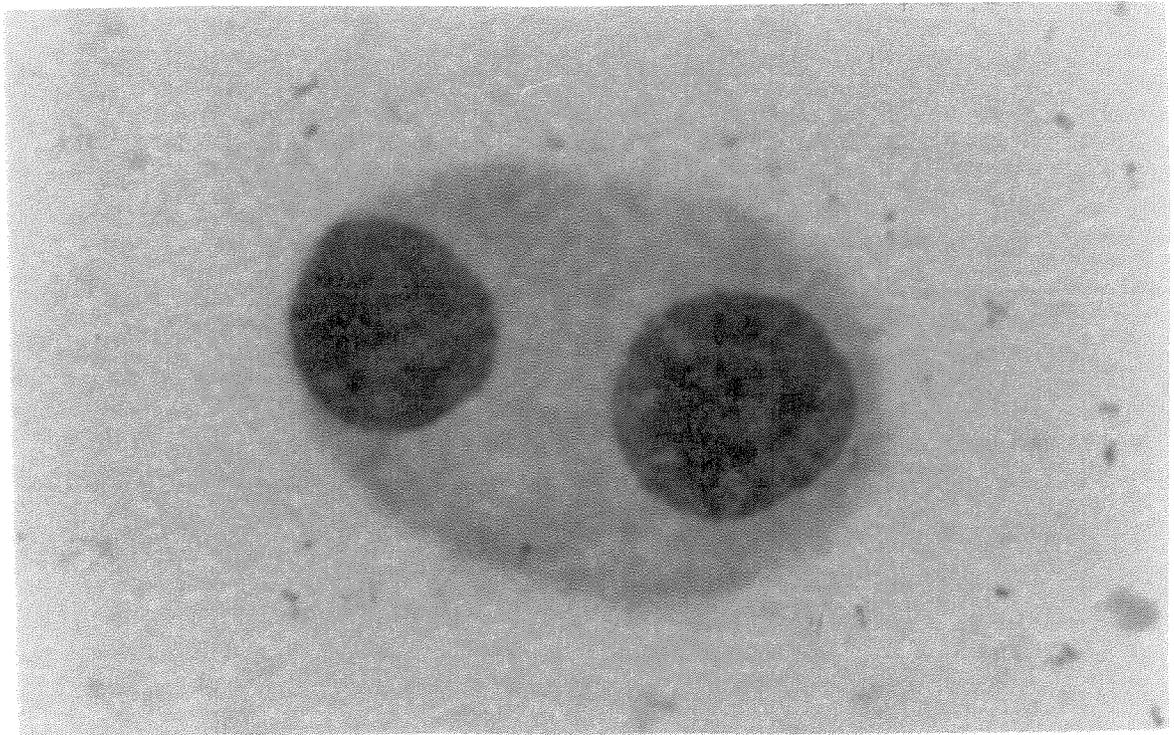


Figura 3 . Linfócito binucleado corado com Giemsa – Wright. Notar o citoplasma e os dois núcleos bem evidentes (Aumento: 1200 X).

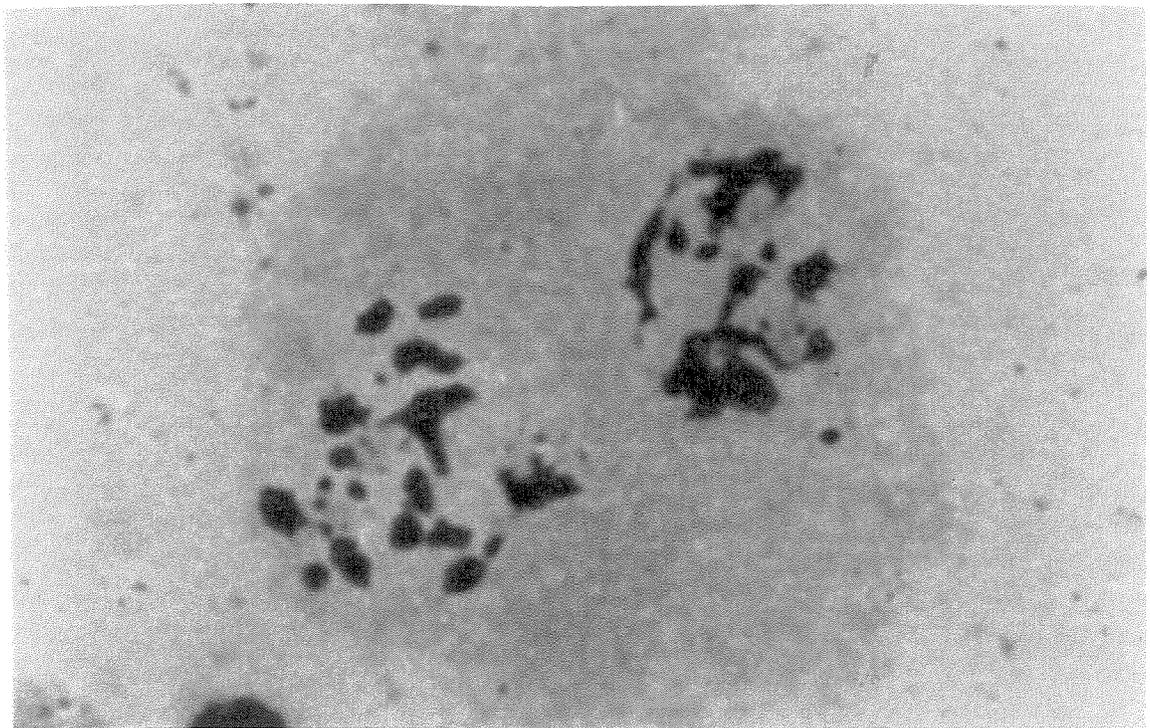


Figura 4. Núcleos apoptóticos (Aumento: 1200 X).

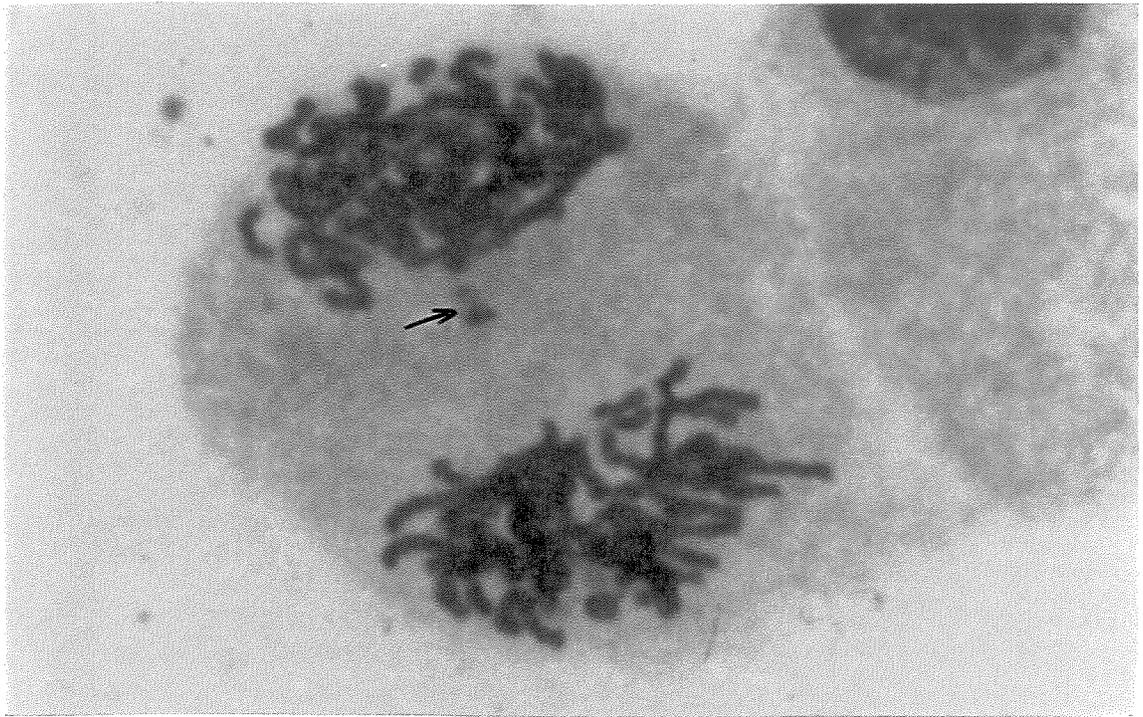
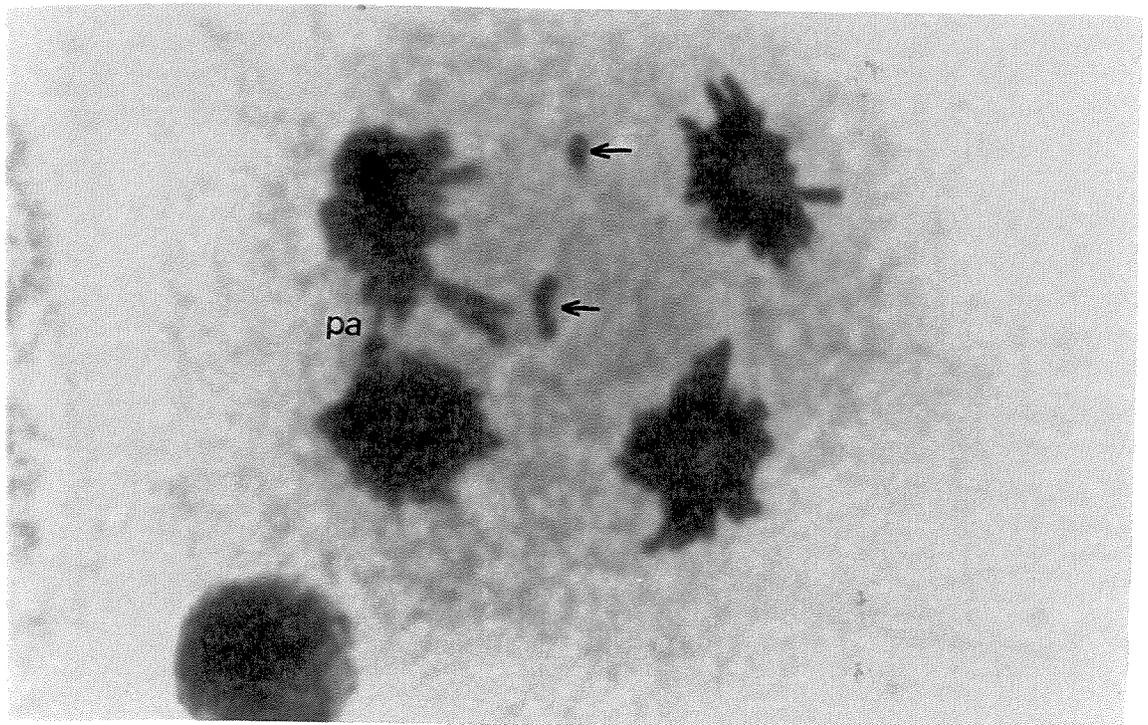


Figura 5. Possível perda ou atraso anafásico (→) em linfócitos binucleados corados com Giemsa – Wright (Aumento: 1200X).



Figuras 6. Perdas cromossômicas (→) e ponte anafásica (pa) em linfócitos binucleados corados com Giemsa – Wright (Aumento: 1200 X).

5 – DISCUSSÃO

A utilização de agroquímicos para controlar as pragas da lavoura é um fato inegável, porém os cuidados com a sua aplicação continuam sendo negligenciados pelos aplicadores e pelo poder público que regulamenta a sua utilização. Vários relatos apontam para a má utilização destes produtos pelo homem (PAUMGARTTEN *et al.*, 1998).

Os resultados obtidos comparando 30 indivíduos expostos a estas substâncias químicas utilizadas nas plantações de Passo Fundo – RS, demonstram que as alterações cromossômicas, sob a forma de micronúcleos, estão presentes em uma freqüência bem mais elevada do que em 30 indivíduos não expostos, da mesma região.

Estes dados estão de acordo com a maioria dos estudos cromossômicos realizados em trabalhadores expostos a misturas de pesticidas, independentemente do parâmetro citogenético avaliado. Assim, aumentos significativos na incidência de aberrações cromossômicas e/ ou no intercâmbio de cromátides irmãs foram constatadas por DE FERRARI *et al.* (1991) em floricultores; por KOURAKIS *et al.* (1992) em trabalhadores em casas de vegetação; e por CARBONELL *et al.* (1995) e BRÉGA *et al.* (1998) em trabalhadores de zonas rurais. Em relação aos micronúcleos, sua freqüência achase significativamente aumentada nos floricultores italianos estudados por

BOLOGNESI *et al.* (1993) embora SCARPATO *et al.* (1996) relatem achados negativos em estudo semelhante.

Com relação a variáveis como hábito de fumar, idade e tempo de exposição, o teste estatístico não apontou diferenças significativas em relação à frequência de células com micronúcleos entre os expostos e não expostos da região de Passo Fundo-RS. Como visto, a influência das variáveis sexo e ingestão de álcool não pode ser avaliada no presente trabalho, devido a presença de apenas três indivíduos de sexo feminino em cada grupo e a de apenas um indivíduo no grupo controle com relato de consumo freqüente de bebidas alcoólicas.

Em relação ao hábito de fumar, os presentes achados estão de acordo com aqueles encontrados por KOURAKIS *et al.* (1992) que estudaram a frequência de aberrações cromossômicas em linfócitos de 29 trabalhadores expostos a uma mistura de pesticidas e não encontraram diferenças significativas entre fumantes e não fumantes. De modo semelhante, BARALE *et al.* (1998) analisaram materiais obtidos em culturas de linfócitos de 1650 indivíduos italianos e não encontraram relação entre o hábito de fumar e o aumento na frequência de micronúcleos.

Conclusões similares foram obtidas por outros pesquisadores que não constataram nenhum efeito do hábito de fumar com relação à frequência de micronúcleos (BOLOGNESI *et al.*, 1993; NORPPA *et al.*, 1993b; STIERUM *et al.*, 1993; VAN HUMMELEN *et al.*, 1993; BONASSI *et al.*, 1994; PITARQUE *et al.*, 1996; THIERENS *et al.*, 1996). Apenas DA CRUZ *et al.* (1994) relatam uma associação significativa entre micronúcleos, hábito de fumar e ingestão de bebida alcoólica, em indivíduos expostos.

Os dados obtidos no presente trabalho revelam que o efeito da exposição a misturas de pesticidas praticamente não é influenciado pelo tabagismo, pois, mesmo a comparação entre não-tabagistas expostos e não-expostos revela a existência de um aumento altamente significativo da frequência de células com micronúcleos no grupo exposto ($p=0,0008$).

Dentre outras variáveis que podem influir na expressão de micronúcleos, a idade tem sido constantemente avaliada. Considera-se que o aumento na frequência de micronúcleos em relação a idade pode ser decorrente do aumento de fragmentos acêntricos, causados por quebras no DNA induzidas endogenamente ou por exposição a clastógenos ambientais, ou por um aumento no número de distúrbios do fuso resultando em atraso cromossômico na anáfase (THIERENS *et al.* 1996).

Uma análise realizada por um grupo Nórdico de pesquisadores (NORDIC STUDY GROUP ON THE HEALTH RISK OF CHROMOSOME DAMAGE, 1990) sobre danos cromossômicos somáticos em mais de 3 000 indivíduos concluíram que as mulheres apresentaram níveis mais elevados de aberrações cromossômicas, de intercâmbios de cromátides irmãs e de micronúcleos do que os homens. Estes achados estão de acordo com os observados por vários autores (HEDNER *et al.*; 1982; MARGOLIN & SHELBY, 1985; GALLOWAY *et al.*, 1986; BENDER *et al.*, 1988) enquanto que outros autores não encontraram nenhum efeito com relação ao sexo (ANDERSON *et al.*, 1991).

No presente trabalho, apenas três indivíduos do sexo feminino foram avaliados em cada grupo, pertencentes a três faixas etárias diferentes (<25 anos ; 40-45 anos; >60 anos). Uma vez que expostos e controles foram emparelhados por sexo e idade, se de fato existir algum efeito desses fatores sobre a análise

de micronúcleos no presente trabalho, o efeito dessas variáveis deve afetar ambos os grupos de modo semelhante.

Embora estudos realizados por BOLOGNESI *et al.* (1993) e FENECH *et al.* (1994) tenham indicado que as mulheres apresentam uma maior frequência de células com micronúcleos do que os homens, SCARPATO *et al.* (1996) não obtiveram resultados semelhantes. A idade também não afetou significativamente a frequência de micronúcleos, embora tenha sido demonstrado que a idade é um parâmetro importante influenciando a frequência de micronúcleos, especialmente aqueles contendo cromossomos inteiros (FENECH, 1993). Segundo SCARPATO *et al.* (1996), a ausência de influência da idade pode ser atribuída à não inclusão de pessoas pertencentes à faixa etária superior a 50 anos na sua amostra.

BONASSI *et al.* (1995) publicaram dados sugerindo que as evidências de um aumento do número de células com micronúcleos em linfócitos femininos ainda não são conclusivas. No entanto, CATALÁN *et al.* (1995) demonstraram que em culturas de linfócitos de mulheres, a prevalência de micronúcleos contendo cromossomos inteiros aumenta com a idade, e que este efeito ocorre mais acentuadamente com o cromossomo X. A presença de seqüências centroméricas do cromossomo X e de cromossomos autossômicos em micronúcleos foi demonstrada por intermédio da técnica de FISH ("Fluorescence *in situ* hybridization). Finalmente, BARALE *et al.* (1998) concluíram que mulheres e indivíduos com idade avançada exibiram valores médios mais altos de intercâmbio de cromátides irmãs e de micronúcleos do que homens e indivíduos mais jovens.

Os dados expressos nas tabelas 3 e 4, demonstram que analisados isoladamente, em relação ao sexo, os indivíduos de idade mais avançada do sexo feminino, tanto no controle quanto nos expostos, apresentaram uma frequência

mais alta de micronúcleos. Estes resultados estão de acordo com resultados obtidos por CATALÁN *et al.* (1995) e BARALE *et al.* (1998).

PÁLDY *et al.* (1987) além de observarem que a exposição a uma mistura de pesticidas pode produzir efeitos citogenéticos em células somáticas humanas, também verificaram uma tendência no aumento da taxa de aberrações cromossômicas com relação ao tempo de exposição, situada em torno de 11 a 15 anos, que decresce após 15 anos de exposição. O efeito aditivo do consumo de álcool e do hábito de fumar na indução de aberrações cromossômicas não pôde ser inequivocamente provado devido ao limitado número de indivíduos investigados. Doenças agudas bem como crônicas foram mais freqüentes em trabalhadores entre 21 e 40 anos de idade do que no grupo controle. Entretanto, não parece claro se a aparente diminuição das taxas de quebras cromossômicas em indivíduos com mais de 15 anos de exposição reflete um fenômeno mais eficiente de eliminação de células anômalas, ou se apenas os indivíduos mais hígidos persistiriam por mais anos no mesmo ambiente de trabalho.

Nossos dados não permitem esclarecer essa questão, uma vez que o tempo de exposição não exerceu influência significativa sobre a freqüência de micronúcleos. Cabe mencionar que o tempo médio de exposição dos trabalhadores rurais expostos da região de Passo Fundo aqui estudados foi de 10,7 anos, situando-se muito próximo da faixa crítica delineada por PÁLDY *et al.* (1987). Com efeito, dentre os 30 trabalhadores examinados, 15 apresentavam tempo de exposição inferior a 10 anos, 11 situavam-se entre 10 e 15 anos e apenas 4 estavam expostos há mais de 15 anos. Os valores médios de células com micronúcleos para cada um desses três grupos foram: 13; 15,5 e 14,5, respectivamente.

CARBONELL *et al.* (1995) observaram uma redução na quantidade de aberrações cromossômicas em seus estudos com um grupo de agricultores, durante o período de baixa exposição, o que está de acordo com os achados de outros investigadores (¹VAN BAO *et al.*, 1974) os quais relataram que em pacientes sofrendo de intoxicação aguda por inseticida organofosforado, a alta taxa de quebras cromatídicas foi reduzida a valores do controle em aproximadamente seis meses. Esta redução pode ser atribuída ao fato de que aqueles linfócitos carregando aberrações cromossômicas tenham sido eliminados ou diluídos na corrente circulatória.

Entretanto, os trabalhadores rurais da Região de Passo Fundo sofrem um processo de exposição contínua já que as culturas se sucedem com pequenos intervalos de tempo entre uma e outra. Como se sabe, a cultura de trigo é característica do inverno e a de soja de verão, a colheita de uma implica no plantio da outra.

Medidas de proteção devem ser intensificadas na tentativa de proteger os trabalhadores rurais responsáveis pelo manuseio e aplicação dos praguicidas. As informações obtidas em pesquisas utilizando material proveniente destes profissionais precisam retornar até eles sob a forma de esclarecimentos, visando melhorar a qualidade de vida do trabalhador rural.

¹VAN BAO *et al.*, 1974 *apud* CARBONELL *et al.*, 1995.

6 - CONCLUSÕES

A partir dos dados obtidos pela análise das culturas de linfócitos periféricos de 30 trabalhadores rurais expostos a agroquímicos da região de Passo Fundo-RS, comparados com 30 indivíduos não expostos, pode-se concluir que :

- houve um aumento significativo na frequência de micronúcleos nos indivíduos expostos;
- as variáveis hábito de fumar, idade e tempo de exposição, não influenciaram de modo significativo a ocorrência de micronúcleos, tanto nos indivíduos expostos quanto nos controles;
- o teste do micronúcleo demonstrou ser um ensaio biológico eficiente para o monitoramento da exposição a misturas de pesticidas nessa população.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, D.; FRANCIS, A.J.; GODBERT, P.; JENKINSON, P.C. & BUTTERWORTH, K.R. Chromosome aberrations (CA), sister chromatid exchanges (SCE) and mitogen-induced blastogenesis in cultured peripheral lymphocytes from 48 control individuals sampled 8 times over 2 years. **Mut. Res.** , **250**: 467-476, 1991.
- AYRES, M. & AYRES, M.A.Jr. BioEstat: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Manaus: Sociedade Civil Mamirauá, MCT-CNPq, 193p, 1998.
- BALAJI, M. & SASIKALA, K. Cytogenetic effect of malathion in “*in vitro*” culture of human peripheral blood. **Mut. Res.** , **301**:13-17, 1993.
- BARALE, R.; CHELOTTI, L.; DAVIVI, T.; DEL RY, S.; ANDREASSI, M.G.; BALLARDIN, M.; BULLERI, M.; HE, J.; BALDACCI, S.; DI PEDE, F.; GEMIGNANI, F. & LANDI, S. Sister chromatid exchange and micronucleus frequency in human lymphocytes of 1650 subjects in an Italian population: II. Contribution of Sex, age, and lifestyle. **Environm. Mol. Mutag.** , **31**: 228-242, 1998.
- BENDER, M.A.; PRESTON, R.J.; LEONARD,R.C.; PYATT, B.E.; GOOCH, P.C.; & SHELBY, M.S. Chromosomal aberration and sister-chromatid frequencies in peripheral lymphocytes of a large human population sample. **Mut. Res.** , **204**: 421-433, 1988.

- BERG, K. Damage in man caused by environmental agents. **Academic Press**, New York, London, 1979.
- BONASSI, S.; BOLOGNESI, C.; ABBONDANDOLO, A.; BARALE, R.; BIGATTI, P.; CAMURRI, L.; DALPRA, L.; DE FERRARI, M.; FORNI, A.; LANDO, C.; PADOVANI, P.; PASQUINI, R.; STELLA, M. & PUNTONI, R. Influence of sex on cytogenetic end points: Evidence from a large human sample and review of the literature. **Cancer Epid. Biomarkers Prev.** , 4: 671-679, 1995.
- BONASSI, S.; CEPPI, M.; FONTANA, V.; & MERLO, F. Multiple regression analysis of cytogenetic human data. **Mut. Res.**, 323: 69-84, 1994.
- BOLOGNESI, C.; PARRINI, N.; BONASSI, S.; IANELLO, G. & SALANITO, A. 1993. Cytogenetic analysis of a human population occupationally exposed to pesticides, **Mut. Res.**, 285: 239-249, 1993.
- BRÉGA, S. M.; VASSILIEFF, I.; ALMEIDA, A ; MERCADANTE, A ; BISSACOT, D.; CURY, P. R & FREIRE-MAIA, D. V. Clinical, cytogenetic and toxicological studies in rural workers exposed to pesticides in Botucatu, São Paulo, Brazil. **Cad. Saúde Pública**, 14 (Sup. 3): 109 –115, 1998.
- CARBONELL, E.; VALBUENA, A.; XAMENA, N.; CREUS, A. & MARCOS, R. Temporary variations in chromosomal aberrations in a group of agricultural workers exposed to pesticides. **Mut. Res.**, 344: 127-134, 1995.
- CATALÁN, J.; AUTIO, K.; WESSMAN, M.; LINDHOLM, C.; KNUUTILA, S.; SORSA, M. & NORPPA, H. Age-associated micronuclei containing centromeres and the X chromosome in lymphocytes of human. **Cytogenet. Cell Genet.**, 68: 11-16, 1995.

- CAVANEY, W. K.; DRYJA, T. P.; PHILLIPS, R. A.; BENEDICT, W. F.; GOBOUT, R.; GALLIC, B. L.; MURPHEE, A. L.; STRONG, L. C., & WHITE, R. L. Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma. **Nature**, **305**: 779-784, 1983.
- CROSSEN, P.E.; MORGAN, W.P. & HORAN, J.J. Cytogenetic studies of pesticide and herbicide sprayers, **N. Zealand Med.**, **88**: 192-195, 1978.
- COUNTRYMAN, P.I. & HEDDLE, J.A. The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. **Mut. Res.**, **41**: 321-332, 1976.
- CZEIZEL, E.; KIRALY, J. and RUZICKSKA, P. Proceedings: Studies on chromosomal mutations in workers producing organophosphate insecticides. **Mut. Res.**, **29**(2): 279, 1976.
- DA CRUZ, A. D.; MCARTHUR, A. G.; SILVA, C.C.; CURADO, M.P., & GLICKMAN, B.W. 1994. Human micronucleus counts are correlated with age, smoking, and cesium-137 dose in the Goiania (Brazil) radiological accident. **Mut. Res.**, **313**: 57-68, 1994.
- DE FERRARI, M.; ARTUSO, M.; BONASSIN, S.; BONATI, S.; CAVALIERRI, Z.; PESCATORE, F.; MARCHINI, E.; PISANO, V. & ABBONDANDOLO, A.. Cytogenetic biomonitoring of an Italian population exposed to pesticides: chromosome aberration and sister-chromatid exchange analysis in peripheral blood lymphocytes. **Mut. Res.**, **260**: 105-113, 1991.

- DESI, J.; NEHEZ, M.; PALOTAS, M.; TEMPLI, A.; HOGYE, A. & VETRO, G. Experience of health status surveillance of pesticides workers in Hungary. **Med. del Lavoro**. **81**: 517-523, 1990.
- EASTMOND, D.A. & TUCKER, J.D. Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. **Environ. Mol. Mutagen.**, **13**: 34-43, 1989.
- FENECH, M. The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human population. **Mut. Res.** , **285**: 35-44, 1993
- FENECH, M. & MORLEY, A. A. Measurement of micronuclei in lymphocytes. **Mut. Res.**, **147**: 29-36, 1985..
- FENECH, M.; NEVILLE, S. & RINALDI, J. Sex is an important variable affecting spontaneous micronucleus frequency of normal men and women. **Hum. Genet.**, **39**: 329-337, 1994.
- FORGET, G. . Pesticides and the third world. **J. Toxicol. Environm. Health**, **32**: 11-31, 1991.
- GALLOWAY, S.M.; BEERY, P.K.; NICHOLS, W.W.; WOLMAN, S.R.; SOPER, K.A.; STOLLEY, P.D. & ARCHER, P. Chromosome aberrations in individuals occupationally exposed to ethilene oxide, and in a large control population. **Mut. Res.**, **170**: 55-74, 1986.
- GELMINI, G. A & NOVO, J.P.S. – Defensivos agrícolas : informações básicas. Fundação Cargill, Campinas, SP, 1987, 577p.

GEORGIEVA, V.L. Cytogenetic investigations in agricultural workers in occupational contact with pesticides. *Med. Genet*, 279-300, 1977.

GHOSH, B.B.; TALUKDER, G.; SHARMA, A. Frequency of micronuclei induced in peripheral lymphocytes by trimethyltin chloride. *Mut. Res.* , 245: 33-39, 1990.

HEDDLE, J.A.; CIMINO, M.C.; HAYASHI, M.; ROMAGNA, F.; SHELBY, M.D.; TUCKER, J.D.; VANPARYS, P. & MACGREGOR, J.T. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present and future. *Environm. Mol. Mutagen.*, 18: 277-291, 1991.

HEDNER, K.; HÖGSTEDT, B.; KOLNIG, A.M.; MARK-VENDEL, E.; STRÖMBECK, B. & MITELMAN, F. Sister chromatid exchanges and structural chromosome aberrations in relation to age and Sex. *Hum. Genet.*, 62: 305-309, 1982.

HÖGSTEDT, B.; GULBERG, B.; VENDEL, E.M.; MITELMAN, F. & SKERFVING, S. Micronuclei and chromosome aberrations in bone marrow cells and lymphocytes of humans exposed mainly to petroleum vapors. *Hereditas*, 94: 179-187, 1981.

HÖGSTEDT, B.; GULBERG, B.; HEDNER, K.; KOLNIG, A.M.; MITELMAN, F.; SKERFVING, S. & WIDERGREN, B. 1983. Chromosome aberration and micronuclei in bone marrow cells and peripheral blood lymphocytes in human exposed to ethylene oxide. *Hereditas*, 98: 105-113, 1983.

HÖGSTEDT, B. Micronuclei in lymphocytes with preserved cytoplasm. A method for assessment of cytogenetic damage in man. *Mutat. Res.* 130: 63-72, 1984.

INTERNACIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Occupational Exposures in Insecticide Application and some Pesticides. Vol. 53, Lyon, France, 1991.

JEYARATNAM, J.: Occupational health issues in developing countries. **Env. Res.** **60**: 207-212, 1993.

KAPP, R. W.; PICCIANO, D.J. & JACOBSON, C. B. Y-Chromosomal nondisjunction in dibromochloropropane exposed workmen. **Mut. Res.**, **64**(1): 47-51, 1979.

KIRÁLY, J.; SZENTEZI, I.; RUZICSKA, M. & CZEIZEL, A. Chromosome studies in workers producing organophosphate insecticides. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.** , 309-319, 1979.

KLEIN, G. The role of gene dosage and genetic transposition in carcinogenesis . **Nature**, **294**: 313-316, 1981.

KOIFMAN, S. Câncer ambiental e ocupacional na América Latina. **Cad. de Saúde Pública**, **14** (Sup. 3): 4-5, 1998.

KOURAKIS, A.; MOURATIDOU, M.; KOKKINOS, G.; BARBOUTI, A.; KOTSIS, A.; MOURELATOS, D. & DOZI-VASSILIADES, J. 1992 Frequencies of chromosomal aberrations in pesticide sprayers working in plastic green houses. **Mut. Res.** , **279**: 145-148, 1992.

- KURTZ, P.J.; DESKIN, R. & HARRINGTON, R. M. Pesticide. In Hayes AW (ed): "Principles and Methods of Toxicology." vol. 5, New York, Raven Pres, 137-167, 1989.
- LARRIPA, I.E.; MUTOS, M.L.; diVENUEZA & BRIEUX de SALUM, S. Sister chromatid exchanges in a human population accidentally exposed to an organophosphorus pesticide. **Rev. Bras. de Genetica**, 6: 719-727, 1983.
- LOPES, E.R.;MENDONÇA;G.A.S.;GOLDFARB, L.M.C.S.;AGUINAGA,S.;COSTA E SILVA, V.L.;MATTOS, I.E.;CURADO, M.P.;SAKAMOTO, L.H.;FONSECA, L.A.M.;TABAK, DE SIQUEIRA, M.S.N.;RUMJANEK, V.M.;ROSEMBERG, J.;DE MORAES, M.S.A.;BORGES, N.F.;CARDOSO, V.M. & ETGES, V.E. Câncer e meio ambiente. **Rev. Bras. de Cancerologia**, 38 (1): 35-64, 1992.
- MÄKI-PAKKANEN, J. Chromosome aberrations, micronuclei and sister-chromatid exchanges in blood lymphocytes after occupational exposure to low levels of styrene. **Mut. Res.**, 189: 399-406, 1987.
- MARGOLIN, B.H. & SHELBY, M.D. Sister chromatid exchanges: a reexamination of the evidence for sex and race differences in humans. **Environ. Mutagen.**, 7: suppl. 4, 63-72., 1985.
- MIGLIORE, L.; PARRINI, M.; SBRANA, I., BIAGINI, C.; BATTAGLIA, A. & LOPRIENO, N. Micronucleated lymphocytes in people occupationally exposed to potential environmental contaminants: the age effects. **Mut. Res.**, 256: 13-20, 1991.

- NEHÉZ, M.; BERENCZI, G.; PÁLDY, A.; SELYPES, A.; CZEIZEL, E.; SZENTESI, I.; CZANKÓ, J.; LÉVAY, K.; MAURER, J. and NAGY, E. Data on the chromosome examinations of workers exposed to pesticides. **Regul. Toxicol. Pharmacol.**, 1: 116-122, 1981.
- NISE, G.; HOGSTEDT, B.; BRATT, I. & SKERFVING, S. Cytogenetic effects in rotogravure printers exposed to toluene (and benzene). **Mut. Res.**, 261:(3), 217-223, 1991.
- NORDIC STUDY GROUP ON THE HEALTH RISK OF CHROMOSOME DAMAGE.
A Nordic data base on somatic chromosome damage in humans. **Mut. Res.**, 241: 325- 337, 1990.
- NORPPA, H.; RENZI, L. & LINDHOLM, C. Detection of whole chromosomes in micronuclei of cytokinesis-blocked human lymphocytes by antikinetochore staining and *in situ* hybridization. **Mutagenesis**, 8:(6) 519-225, 1993a.
- NORPPA, H.; LUOMAHAARA, S.; HEIKANEN, H.; ROTH, S.; SORSA, M.; RENZI, L. & LINDHOLM, C. Micronucleus assay in lymphocytes as a tool to biomonitor human exposure to aneuploidogens and clastogens. **Environ. Health Perspect.**, Suppl., 101:(Suppl.3), 139-143, 1993b
- PAGE, H. S. & ASIRE, A. J. Cancer rates and risks. **Nat. Inst. of Health. Pub**, 85: 691, 1985.
- PANNEERSELVAM, N.; SINHA, S. & SHANMUGAM, G. Genotoxicity of the herbicide fluchloralinon human lymphocytes "*in vitro*": chromosomal aberration and micronucleus tests. **Mut. Res.**, 344: 69-72, 1995.

- PÁLDY, A.; PUSKÁS, N.; VINECZE, K. & HADHÁZI, M. Cytogenetic studies on rural populations exposed to pesticides. **Mut. Res.**, **187**: 127-132, 1987.
- PAUMGARTTEN, F.J.R.; DELGADO, F.F.; OLIVEIRA, E.S.; ALLELUIA, I.B.; BARRETO, H.H.C. & KUSSUMI, T.A. Levels of organochlorine pesticides in the blood serum of agricultural workers from Rio de Janeiro state, Brazil. **Cad. Saúde Pública**, **14**:(Sup. 3), 33-39, 1998.
- PITARQUE, M.; CARBONELL, E.; LAPENA, N.; MARSÀ, M.; TORRES, M., CREUS, A.; XAMENA, N. & MARCOS, R. No increase in micronuclei frequency in cultured blood lymphocytes from a group of filling station attendants. **Mut. Res.** , **367**: 161-167, 1996.
- RABELLO, M.M.; DeALMEIDA, W.F. & PIGATI, P. Cytogenetic study on individuals occupationally exposed to DDT. **Mut. Res.**, **28**: 339-354, 1975.
- RABELLO-GAY, M.N.; RODRIGUES, M. A. L. R. & MONTELEONE-NETO, R. – **Mutagênese, teratogênese e carcinogênese : métodos e critérios de avaliação.** São Paulo, Sociedade Brasileira de Genética, 1991. 241p.
- REALI, D.; DI MARINO, F.; BAHRAMANDPOUR, S.; CARDUCCI, A.; BARALE, R. & LOPRIENO, N. Micronuclei in exfoliated urothelial cells and urine mutagenicity in smokers. **Mut. Res.** , **192**: 145-149, 1987.

- ROGAN, W.J.; GLADEN, B.C.; MCKINNEY, J.D.; CARRERAS, N.; HARDY, P.; TINGELSTAD, J & TULLY, M. Polychlorinated biphenyls (PCBs) and dichlorodiphenyl dichloroethene (DDE) in human milk: effects of maternal factors and previous lactation. **Am. Journal Public Health.**, **76**: 172-176, 1986.
- ROWLEY, J.D. Biological implications of consistent chromosome rearrangements in leukemia and lymphoma. **Cancer Res.**, **44**: 3159-3161, 1984.
- SARTO, F.; TOMANIN, R.; GIACOMELLI, L.; CANOVA, A.; RAIMONDI, F.; GHIOTTO, C. & FIORENTINO, M.V. Evaluation of chromosomal aberrations in lymphocytes and micronuclei in lymphocytes, oral mucosa, and hair root cells of patients under antineoplastic therapy. **Mut. Res.** , **228**: 157-169, 1990.
- SCARPATO, R.; MIGLIORE, L.; ANGOTZI, G.; FEDI, A.; MILIGI, L. & LOPRIENO, N. Cytogenetic monitoring of a group of Italian floriculturists: no evidence of DNA damage related to pesticide exposure. **Mut. Res.**, **367**: 73-82, 1996.
- SCHMID, W. The micronucleus test. **Mut. Res.** , **3**: 9-15, 1975.
- SHABTAI, E.; BICHACHO, S. & HALBRECHT, I. Cytogenetic observation in infertile men working with insecticidal compounds. **Acta Genet. Med. Gemellol. (Rome)**, **27**: 51-56, 1979.
- SORSA, M.; MÄKI-PAAKKANEN, J. & VAINIO, H. A chromosome study among worker groups in the rubber industry, Scand. **J. Work Environ. Health**, **9**:(Suppl. 2), 43-47, 1983.

- SORSA, M.; PYY, L.; SALOMAA, S.; NYLUND, L. & YAGER, J.V. Biological and environmental monitoring of occupational exposure to cyclophosphamide in industry and hospitals. **Mut. Res.** , **204**: 465-479, 1988.
- STENSTRAND, K. Effects of ionizing radiation on chromosome aberrations, sister chromatid exchanges and micronuclei in lymphocytes of smokers and non smokers. **Hereditas**, **102**: 71-76, 1985.
- STICH, H.F.; STICH, W. & PARIDA, B.B. Elevated frequency of micronucleated cells in the buccal mucosa of individuals at high risk for oral cancer: betel quid chewers. **Cancer Lett.**, **17** 125-134, 1982.
- STIERUM, R.H.; HAGEMAN, G.J.; WELLE, I.J.; ALBERING, H.J.; SCHREURS, J.G. & KLEINJANS, J.C. Evaluation of exposure reducing measures on parameters of genetic risk in a population occupationally exposed to coal fly ash. **Mut. Res.**, **319**: 245-255., 1993.
- SURRALLÉS, J.; CATALÁN, J.; CREUS, A.; NORPPA, H.; XAMENA, N & MARCOS, R. Micronuclei induced by alachlor, mitomycin C and vinblastine in human lymphocytes : Presence of centromeres and kinetochores and influence of staining technique. **Mutagen.**, **10**: 417-423, 1995.
- THIERENS, H.; VRAL, A. & DE RIDDER, L. A cytogenetic study of radiological workers: Effect of age, smoking and radiation burden on the micronucleus frequency. **Mut. Res.**, **360**: 75-82, 1996.

- TITENKO-HOLLAND, N.; MOORE, L.E.; ZHANG, L.; PARVATHAM, L.S. & SMITH, M. T. Micronuclei in human lymphocytes and exfoliated cells as biomarkers of genetic damage. Proceedings of the 2nd International Conference on Environment Mutagens in Human Populations, Prague, August 20-25; 1-31, 1995.
- TITENCKO-HOLLAND, N.; WINDHAM, G.; KOLACHANA, P.; REINISCH, F.; PARVATHAM, S.; OSORIO, A.M. & SMITH, M.T. Genotoxicity of malathion in human lymphocytes assessed using the micronucleus assays in vitro and in vivo: a study of malathion-exposed workers. *Mut. Res.*, **388**: 85-95, 1997.
- TSUTSUI, T.; MCLACHLAN, J.A. & BARRET, J.C. Aneuploidy induction and cell transformation by diethylstilbestrol: A possible chromosomal mechanism in carcinogenesis. *Cancer Res.* , **43**: 3814-3821, 1983.
- VAINIO, H. Current trends in the biological monitoring of exposure to carcinogens, *Scand. J. Work Environ. Health*, **11**: 1-6, 1985.
- VAN HUMMELEN, P.; GENNART, J.P.; BUCHET, J.P.; LAUWERYS, R. & KIRSCH-VOLDERS, M. Biological markers in PAH exposed workers and controls. *Mut. Res.*, **300**: 231-239, 1993.
- VARELLA-GARCIA, M. Teste de trocas entre cromátides-irmãs (TCI). In: RABELLO-GAY, M.N.; RODRIGUES, M.A.L.R. & MONTELEONE-NETO, R. – **Mutagênese, teratogênese e carcinogênese : métodos e critérios de avaliação.** São Paulo, Sociedade Brasileira de Genética, 1991, p.123-140.
- VOLNJANSKAYA, A.B. & VASILOS, A.F. Level of chromosome aberrations in agricultural workers. *Gig. I Truda.*, **12**: 47-48, 1981.

YAGER, J. W.; SORSA, M. & SELVIN, S. Micronuclei in cytokinesis-blocked lymphocytes as an index of occupational exposure to alkylating cytostatic drugs. In: (BARTSCH, H., HEMMINKI, K. and O'NEILL, I. K. (Eds.)). *Methods for Detecting DNA Damaging Agents in Humans: Applications in Cancer Epidemiology and Prevention* IARC. Lyon: **Scien. Public. Intern. Agency for Res. on Cancer.** (89) 213-216, 1988.

YODER, J.M.; WATSON & BENSON, W.W. Lymphocyte chromosome analysis of agricultural workers during extensive occupational exposure to pesticides. *Mut. Res.*, **21**: 335-340, 1973.

YUNIS, J.J. The chromosomal basis of human neoplasia. *Science*, **221**: 227-236, 1983.

ZAMBRONE, F.A. D. Perigosa Família. *Ciência Hoje*, **4** (22) : 44-47, 1986.

8 – ANEXOS

8.1 - FICHA DE COLETA DE DADOS - AGRICULTOR

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(Projeto Micronúcleos X agroquímicos)

I – DADOS DE IDENTIFICAÇÃO

Nome:

Endereço:.....

Cidade:.....

Sexo: Masc. Feminino

Idade:anos

Profissão: Tempo de exposição:.....

II –HÁBITOS

Tabagismo: sim não N° de cigarros diários:.....

III- Consumo de álcool: sim não Doses diárias:

IV – Exames realizados:

Raios X sim não Data:.....

Sangue sim não Tipo:

Data:/...../.....

Responsável:.....

8.2 - FICHA DE COLETA DE DADOS - CONTROLE

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

(Projeto Micronúcleos X agroquímicos)

I – DADOS DE IDENTIFICAÇÃO

Nome:

Endereço:.....

Cidade:.....

Sexo: Masc. Feminino

Idade:anos.

II –HÁBITOS

Tabagismo: sim não N° de cigarros diários:.....

III- Consumo de álcool: sim não Doses diárias:

IV – Exames realizados:

Raios X sim não Data:.....

Sangue sim não Tipo:

Data:/...../.....

Responsável:.....

8.3 – CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

I - Justificativa e objetivos da pesquisa:

Devido a grande número de indivíduos expostos aos defensivos agrícolas, é necessário identificar os danos causados por estas substâncias ao ser humano.

Avaliar o efeito clastogênico da exposição ocupacional a defensivos agrícolas, pelo teste de micronúcleos;

Relacionar a frequência de micronúcleos com a ocorrência de anomalias cromossômicas, nos grupos de risco, por exposição ocupacional a defensivos agrícolas;

Relacionar a ocorrência de micronúcleos ao hábito de fumar, sexo, idade e consumo de álcool, como possíveis potencializadores da ação dos defensivos agrícolas, entre expostos e não expostos.

II - Procedimentos que serão utilizados, e seus propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais:

Coleta de 2 ml de sangue periférico heparinizado, para cultura de linfócitos e posterior identificação dos micronúcleos.

III - Desconfortos ou riscos esperados:

Pequena ardência local após a coleta de sangue.

Riscos: nenhum

IV - Benefícios que se pode obter:

Identificar os possíveis problemas para a saúde do paciente exposto aos defensivos agrícolas, com a finalidade de esclarecer os cuidados a serem tomados ao manipular estes produtos. Estabelecer uma forma de identificar as anomalias geradas pela exposição, ainda em estágio inicial de sua ocorrência de forma que o indivíduo possa receber tratamento adequado.

V - Procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para os indivíduos estudados:

Evitar o contato com substâncias potencializadoras da ação dos agrocitotóxicos, de maneira diminuir os efeitos destas substâncias na indução de doenças que alterem o funcionamento normal das células.

Pelo presente Consentimento Pós-Informação, declaro que fui informado, de forma clara e detalhada, dos objetivos, da justificativa, dos procedimentos a que serei submetido, dos riscos, desconfortos e benefícios do presente Projeto de Pesquisa, assim como dos procedimentos alternativos aos quais poderia ser submetido, todos acima listados. Fui, igualmente, informado:

- da garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida a cerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a Pesquisa;

- da liberdade de retirar meu consentimento, a qualquer momento, e deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo a continuação do meu cuidado e tratamento;

- da segurança de que não serei identificado e que se manterá o caráter confidencial das informações relacionadas com a minha privacidade;

- do compromisso de proporcionar informação atualizada obtida durante o estudo, ainda que esta possa afetar a minha vontade em continuar participando;

- da disponibilidade de tratamento médico e a indenização, conforme estabelece a legislação, caso existam danos a minha saúde, diretamente causados por esta Pesquisa;

- de que se existirem gastos adicionais, estes serão absorvidos pelo orçamento da Pesquisa.

O Pesquisador Responsável por este Projeto de Pesquisa é _____, tendo este documento sido revisado e aprovado pelo Comitê de Ética desta Instituição de atenção à saúde em _____ / _____ / _____.

Data: _____ / _____ / _____

Nome e assinatura do paciente ou voluntário

Nome e assinatura do Responsável legal, quando for o caso

Assinatura do Pesquisador Responsável

Observação : O presente documento, baseado nos artigos 10 a 16 das Normas de Pesquisa em Saúde, do Conselho Nacional de Saúde, será assinado em duas vias, de igual teor, ficando uma via em poder do Paciente ou de seu Representante Legal e outra com o Pesquisador Responsável.



Passo Fundo, 23 de julho de 1998.

DE: Comissão de Ética médica do Hospital São Vicente de Paulo (CEM-HSVP)

PARA: Prof. Adil de Oliveira Pacheco

ASSUNTO: Parecer sobre Projeto de Pesquisa: "Exposição ocupacional à defensivos agrícolas em plantações da região de Passo Fundo - RS: o teste de micronúcleos como indicador de instabilidade cromossômica em trabalhadores rurais.", de autoria do Prof. Adil de Oliveira Pacheco.

Prezado Professor Adil:

Analisando o projeto acima citado não encontramos impedimento ético para a sua execução. Deve entretanto, estar escrito claramente, no consentimento pós-informação, que o paciente será submetido a uma coleta de sangue com o fim específico de fornecer material para a realização da pesquisa.

Também, que a aprovação pela CEM-HSVP, não significa que o HSVP vá assumir eventual custo que a pesquisa possa ter.

Congratulações pela escolha do tema e desejamos que traga retorno significativo para a sociedade.

César A. L. Pires
Secretário da CEM-HSVP

Wágnes B. Franceschi
Presidente da CEM-HSVP

