



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS A SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

Carolina Hilgert Jacobsen Pereira

**A MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE PERIFÉRICA EM AGRICULTORES  
EXPOSTOS A MÚLTIPLOS AGROTÓXICOS**

Florianópolis  
2021



Carolina Hilgert Jacobsen Pereira

**A MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE PERIFÉRICA EM AGRICULTORES  
EXPOSTOS A MÚLTIPLOS AGROTÓXICOS**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de doutora em Farmácia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Cláudia Santos da Silva

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Claudia Regina dos Santos

Florianópolis

2021

FICHA DE IDENTIFICAÇÃO DA OBRA ELABORADA PELO AUTOR,  
ATRAVÉS DO PROGRAMA DE GERAÇÃO AUTOMÁTICA DA BIBLIOTECA UNIVERSITÁRIA DA UFSC.

Jacobsen-Pereira, Carolina Hilgert

A modulação da resposta imune periférica em agricultores  
expostos a múltiplos agrotóxicos / Carolina Hilgert  
Jacobsen-Pereira ; orientador, Maria Cláudia Santos-Silva,  
coorientador, Claudia Regina dos Santos, 2022.

135 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós  
Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. agricultores. 3. agrotóxicos. 4. sistema  
imune. 5. citometria de fluxo. I. Santos-Silva, Maria  
Cláudia. II. Santos, Claudia Regina dos. III. Universidade  
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em  
Farmácia. IV. Título.

Carolina Hilgert Jacobsen Pereira

**A MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE PERIFÉRICA EM AGRICULTORES  
EXPOSTOS A MÚLTIPLOS AGROTÓXICOS**

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof<sup>a</sup>. Míriam Perlingeiro Beltrame, Dr<sup>a</sup>.  
UFPR

Prof<sup>a</sup>. Ariane Zamoner Pacheco De Souza, Dr<sup>a</sup>.  
UFSC

Íris Mattos Santos Pirath, Dra.  
UFSC

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Doutora em Farmácia.

---

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Cláudia Santos da Silva  
Orientadora

Florianópolis, 2021.

Este trabalho é dedicado à minha mãe.

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Maria Cláudia Santos da Silva, por me acolher no Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias (LOEH) e pelo apoio durante esta jornada! Tenho muito orgulho de pertencer a esse grupo de trabalho tão competente!

À Profa. Dra. Claudia Regina dos Santos, minha coorientadora, por todo o suporte e parceria, especialmente, durante o trabalho de campo! Foi inesquecível!

À Universidade Federal de Santa Catarina e ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia.

Às agências de fomento CAPES, CNPq, FAPESC e PPSUS.

À FUNDACENTRO pelo apoio logístico durante o trabalho de campo.

Aos professores Alcíbia Helena Maia, Eduardo Dalmarco e Sharbel Weidner Maluf que se dispuseram a avaliar este trabalho na etapa de qualificação e muito contribuíram no seu aprimoramento.

Às professoras Míriam Perlingeiro Beltrame, Íris Mattos Santos Pirath e Ariane Zamoner Pacheco De Souza que compuseram a banca de avaliação na defesa desta tese.

À colega Íris Mattos Santos Pirath pelo auxílio nas análises, apoio e amizade!

Agradeço especialmente à colega Chandra Chiappin Cardoso por todo o apoio durante a realização deste trabalho!

A toda equipe do LOEH, especialmente à Manoela, Natália, Laura, Amanda, Lisandra, Victória e Bárbara!

À equipe da Unidade de Laboratório de Análises Clínicas do HU, em especial à Heloísa Costa, do Laboratório de Marcadores Celulares.

À minha mãe por todo incentivo, exemplo de perseverança, otimismo e alegria! Muito obrigada por tudo!

Ao meu esposo por toda a inspiração, compreensão e apoio! Sem você seria impossível!

Por fim, agradeço aos agricultores de Santo Amaro da Imperatriz, que depositaram sua confiança em nosso trabalho e consentiram em participar desta pesquisa!

## RESUMO

A exposição ocupacional aos agrotóxicos tem sido considerada um fator predisponente a distúrbios do sistema imunológico. Imunossupressão, autoimunidade, câncer em vários órgãos e outras doenças em pessoas que trabalham expostas a esses produtos tem sido relatado. Este estudo teve como objetivo investigar as células do sistema imune e citocinas plasmáticas em 40 agricultores submetidos à exposição ocupacional a múltiplos agrotóxicos por, pelo menos, 15 anos. Paralelamente, foi avaliado para fins comparativos, um grupo controle sem histórico de exposição. Células circulantes em sangue periférico foram identificadas pelas características de dispersão de luz e por combinações de marcadores celulares em análise por citometria de fluxo utilizando o equipamento FACS Canto II. As células foram identificadas de acordo com os fenótipos como leucócitos totais, monócitos (clássicos, intermediários e não clássicos), neutrófilos (imaturos e maduros), eosinófilos, basófilos e linfócitos. Os linfócitos foram subdivididos em linfócitos T helper, linfócitos T citotóxicos, linfócitos T reguladores, linfócitos B, natural killer e natural killer T. Os linfócitos T foram subclassificados como T naïve, T de memória central, T efetores de memória e T efetores de memória terminal. As células B foram subdivididas em células B imaturas e células B maduras, sendo estas últimas subclassificadas de acordo com seu estágio maturativo. Células dendríticas circulantes (plasmacitoides e mieloides) também foram quantificadas utilizando o painel de anticorpos. Concentrações das citocinas plasmáticas IL-17 A, IFN- $\gamma$ , TNF, IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2 foram avaliadas por citometria de fluxo utilizando o kit BD™ Cytometric Bead Array (CBA Human Th1/Th2/Th17) (Beckton Dickinson, EUA). Os resultados mostraram aumento significativo dos valores relativos e absolutos de neutrófilos imaturos e monócitos e aumento absoluto das células dendríticas, bem como do total de células T, células T citotóxicas de memória central e efectoras de memória nas amostras do grupo de agricultores. Em contrapartida, nesse grupo houve diminuição significativa dos valores absolutos de células B maduras e de linfócitos T efetores de memória terminal. Além disso, foi observado o aumento significativo da concentração de IL-6 no mesmo grupo. Devido ao constante estímulo antigênico que ocorre durante a exposição aos agrotóxicos e o consequente recrutamento de células apresentadoras de antígenos na pele e trato respiratório, as células dendríticas e monócitos estão circulando em maiores quantidades. Nos órgãos linfoides secundários, as células B podem estar com a vida útil aumentada devido aos sinais de sobrevivência gerados pela ligação às células dendríticas que também se encontram nesse local, fazendo com que diminuam na circulação. Os resultados apresentados no presente estudo sugerem que os agricultores avaliados estão mais sujeitos a desenvolver problemas de saúde em função das alterações nas quantidades das células imunes avaliadas.

Palavras-chave: agricultores; agrotóxicos; células imunes; citometria de fluxo.



## ABSTRACT

Occupational exposure to pesticides has been considered a predisposing factor to immune system disorders. Immunosuppression, autoimmunity, cancer of various organs and other diseases in working people exposed to these products have been reported. This study aimed to investigate the immune system cells and plasma cytokines in 40 farmers subjected to occupational exposure to multiple pesticides for at least 15 years. At the same time, a control group with no history of exposure was evaluated for comparative purposes. Circulating cells in peripheral blood were identified by light scattering characteristics and by combinations of cell markers analyzed by flow cytometry using the FACS Canto II equipment. Cells were identified according to phenotypes such as total leukocytes, monocytes (classic, intermediate and non-classical), neutrophils (immature and mature), eosinophils, basophils and lymphocytes. Lymphocytes were subdivided into helper T lymphocytes, cytotoxic T lymphocytes, regulatory T lymphocytes, B, natural killer and natural killer T lymphocytes. T lymphocytes were subclassified as naïve T, central memory T, memory effector T and memory effectors terminal. B cells were subdivided into immature B cells and mature B cells, the latter being subclassified according to their maturation stage. Circulating dendritic cells (plasmacytoid and myeloid) were also quantified using the antibody panel. Plasma cytokine concentrations IL-17A, IFN- $\gamma$ , TNF, IL-10, IL-6, IL-4 and IL-2 were assessed by flow cytometry using the BD™ Cytometric Bead Array kit (CBA Human Th1/Th2 /Th17) (Beckton Dickinson, USA). The results showed a significant increase in the relative and absolute values of immature neutrophils and monocytes and an absolute increase in dendritic cells, as well as in the total number of T cells, central memory cytotoxic T cells and memory effectors in the samples from the group of farmers. On the other hand, in this group, there was a significant decrease in the absolute values of mature B cells and end-memory effector T lymphocytes. Furthermore, a significant increase in the concentration of IL-6 was observed in the same group. Due to the constant antigenic stimulation that occurs during exposure to pesticides and the consequent recruitment of antigen-presenting cells in the skin and respiratory tract, dendritic cells and monocytes are circulating in greater amounts. In secondary lymphoid organs, B cells may have an increased lifespan due to survival signals generated by the attachment to dendritic cells that are also found in this location, causing them to decrease in circulation. The results presented in this study suggest that the evaluated farmers are more likely to develop health problems due to changes in the amounts of the evaluated immune cells.

Keywords: farmers; pesticides; immune cells; flow cytometry

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Classificação toxicológica dos agrotóxicos adotada pela ANVISA em 2019. ....	21
<b>Figura 2.</b> Imunidade inata e adaptativa. ....	25
<b>Figura 3.</b> Maturação das células T no timo. ....	29
<b>Figura 4.</b> Função da molécula CD28 na interação entre APCs e células T.....	31
<b>Figura 5.</b> Esquema ilustrando a diferenciação das células linfoides B.....	34
<b>Figura 6.</b> <i>Dot plots</i> mostrando os <i>singlets</i> , <i>dublets</i> e <i>debris</i> celulares e a seleção da população leucocitária.....	51
<b>Figura 7.</b> <i>Dot plots</i> mostrando <i>gates</i> utilizados para determinar a população linfocitária total. ....	52
<b>Figura 8.</b> Estratégias de <i>gate</i> para a seleção dos neutrófilos, basófilos, monócitos e eosinófilos.....	52
<b>Figura 9.</b> Estratégias de <i>gate</i> para a seleção dos subtipos de linfócitos. ....	53
<b>Figura 10.</b> Estratégias de <i>gate</i> para a seleção dos subtipos de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> e T CD8 <sup>+</sup> . .	54
<b>Figura 11.</b> Estratégias de <i>gate</i> para a análise da ativação das células T CD4 <sup>+</sup> e T CD8 <sup>+</sup> . ....	55
<b>Figura 12.</b> Estratégias de <i>gate</i> para a análise das células T <sub>REG</sub> . ....	56
<b>Figura 13.</b> Estratégias de <i>gate</i> na avaliação de subtipos de células B.....	57
<b>Figura 14.</b> Estratégias de <i>gate</i> para a análise dos neutrófilos maduros e imaturos. ....	58
<b>Figura 15.</b> Estratégias de <i>gate</i> para a análise dos subconjuntos de monócitos, DCs e para os basófilos.....	59
<b>Figura 16.</b> Histogramas de distribuição das sete populações de esferas em função de suas intensidades de fluorescência. ....	60
<b>Figura 17.</b> Comparação da celularidade absoluta entre os grupos avaliados. ....	69
<b>Figura 18.</b> Comparação da celularidade relativa entre os grupos avaliados.....	70
<b>Figura 19.</b> Celularidade relativa e absoluta da população imatura de neutrófilos.....	71
<b>Figura 20.</b> Proporção das subpopulações de monócitos no compartimento monocítico.....	73
<b>Figura 21.</b> Proporção das subpopulações de monócitos em relação aos leucócitos totais. ....	74
<b>Figura 22.</b> Valores absolutos de células dendríticas totais e das subpopulações plasmacitóide e mielóide. ....	75
<b>Figura 23.</b> Valores relativos das pDCs e mDCs considerando as DC totais ....	75
<b>Figura 24.</b> Proporção dos valores relativos de linfócitos T <i>naïve</i> , T <sub>CM</sub> , T <sub>EM</sub> e T <sub>EM RA</sub> nas populações T CD4 e T CD8. ....	78
<b>Figura 25.</b> Proporção das populações de T <sub>REG</sub> em relação aos linfócitos T totais. ....	80

<b>Figura 26.</b> Valores relativos e absolutos de linfócitos B imaturos e maduros. ....	81
<b>Figura 27.</b> Avaliação das células B quanto ao estágio maturativo. ....	82
<b>Figura 28.</b> Proporção das células B <sub>REG</sub> e B <sub>REG</sub> CD27 <sup>+</sup> em relação às células B totais.....	84
<b>Figura 29.</b> Distribuição das células NK, NK CD56 <sup>++</sup> e NKT em relação aos linfócitos totais. .....	84

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Volume de sangue periférico adicionado aos Tubos 2, 3 e 4. ....	46
<b>Tabela 2.</b> Volume de sangue periférico adicionado ao tubo 6.....	47
<b>Tabela 3.</b> Painel de anticorpos monoclonais.....	47
<b>Tabela 4.</b> Informações técnicas dos anticorpos monoclonais utilizados no painel.....	48
<b>Tabela 5.</b> Informações técnicas dos anticorpos monoclonais utilizados no painel.....	49
<b>Tabela 6.</b> Características gerais das populações avaliadas. ....	62
<b>Tabela 7.</b> Avaliações hematológicas, bioquímicas e hormonais dos agricultores.....	63
<b>Tabela 8.</b> Agrotóxicos utilizados pelos trabalhadores rurais e classificações toxicológicas...65	
<b>Tabela 9.</b> Celularidade relativa e absoluta da população de neutrófilos maduros.....	71
<b>Tabela 10.</b> Valores absolutos de monócitos clássicos, intermediários e não clássicos.. ....	72
<b>Tabela 11.</b> Valores percentuais de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> , T CD8 <sup>+</sup> , T $\gamma\delta^+$ , T DP e T DN.....	76
<b>Tabela 12.</b> Valores absolutos das subpopulações de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> e T CD8 <sup>+</sup> . ....	77
<b>Tabela 13.</b> Distribuição dos marcadores de ativação nos linfócitos T CD4 e T CD8.....	79
<b>Tabela 14.</b> Valores absolutos das células T <sub>REG</sub> e das populações <i>naïve</i> e memória.....	80
<b>Tabela 15.</b> Valores absolutos das células B e das subpopulações em diferentes estágios maturativos. ....	83
<b>Tabela 16.</b> Valores absolutos das células NK e subpopulação NK CD56 <sup>++</sup> e das NKT. ....	85
<b>Tabela 17.</b> Comparação das concentrações plasmáticas de citocinas entre os grupos. ....	85
<b>Tabela 18.</b> Correlações significativas entre colinesterases e células do SI. ....	86
<b>Tabela 19.</b> Correlações significativas entre glicemia e HbA1c e células T <sub>REG</sub> . ....	86

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AF647	<i>Alexa Fluor 647</i>
AChE	Acetilcolinesterase
AGROFIT	Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários
ALT	Alanina Aminotransferase
APC	Alofocianina
APCs	Células Apresentadoras De Antígenos
APCH7	Alofocianina H7
AR	Artrite Reumatoide
AST	Aspartato Aminotransferase
ATP	Adenosina Trifosfato
BChE	Butirilcolinesterase
Bcl-2	Do inglês, <i>B-cell lymphoma-2</i>
BCR	Receptor de Célula B
BM	B de memória
B <sub>REG</sub>	Linfócitos B Reguladores
BV421	<i>Brilliant Violet 421</i>
CBA	Cytometric Bead Array
CBM	Carbamatos
CCR7	Receptor de Quimiocina C-C tipo 7
CEPSH	Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
CG	Centro Germinativo
CM	Memória Central
cMOS	Monócitos Clássicos
CD	Do inglês, <i>Cluster of Differentiation</i>
CS	Do inglês, <i>Class Switched</i>
CTLs	Linfócitos T Citotóxicos
DCFI	2,6-diclorofenolindofenol
DCs	Células Dendríticas
DL <sub>50</sub>	Dose Letal Mediana
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DTNB	Ácido Ditionitrobenzóico

EDTA/K3	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético/Tripotássico
ELISA	Do inglês, <i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
EM	Efectoras de Memória
EM RA	Efectoras de Memória RA
EPI	Equipamento de Proteção Individual
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
FoxP3	Fator de Transcrição, do inglês, <i>Forkhead box P3</i>
GABA	Ácido Gama-Aminobutírico
GGT	Gama Glutamiltransferase
GHS	Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos
GM-CSF	Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos
HbA1c	Hemoglobina Glicosilada
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
HU	Hospital Universitário
IARC	Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IFN- $\gamma$	Interferon Gama
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
INCA	Instituto Nacional do Câncer
iMOS	Monócitos Intermediários
LES	Lúpus Eritematoso Sistêmico
LOEH	Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias
MALT	Tecidos Linfoides Associados à Mucosa
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
mDCs	Células dendríticas mieloides
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
mRNA	Ácido Ribonucleico Mensageiro
MS	Ministério da Saúde
ncMOS	Monócitos Não Clássicos
NET	Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos
NK	Do inglês, <i>Natural killer</i>

NKT	Do inglês, <i>Natural killer T</i>
NOS	Espécies Reativas de Nitrogênio
NS	Do inglês, <i>Non Switched</i>
OF	Organofosforados
OMS	Organização Mundial de Saúde
P53	Proteína 53
PacB	<i>Pacific Blue/V450</i>
PacO	<i>Pacific Orange/V500</i>
PBS	Solução Tampão Fosfato Salina
PCR	Proteína C Reativa
pDCs	Células Dendríticas Plasmocitoides
PE	Ficoeritrina
PECY7	Ficoeritrina Cy7
PerCP CY5-5	Proteína Clorofila Peridina
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
SC	Santa Catarina
SI	Sistema Imune
SIDRA	Sistema de Recuperação Automática
SP	Sangue Periférico
STZ	Estreptozotocina
T <sub>REG</sub>	Linfócitos T Reguladores
TCR	Receptor de Células T
TGF	Fator Transformador de Crescimento
Th	Células T Auxiliadoras
TLR	Do inglês, <i>Toll Like Receptors</i>
TNB	5-tio-2-nitrobenzóico
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TSH	Hormônio Tireoestimulante
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TTEL	Testosterona Livre
UFSC	Universidade Federal De Santa Catarina
ULAC	Unidade de Laboratório de Análises Clínicas

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>19</b>
<b>2.1</b>	<b>AGROTÓXICOS: TOXICOLOGIA OCUPACIONAL .....</b>	<b>19</b>
<b>2.2</b>	<b>O SISTEMA IMUNE NA RESPOSTA À TOXICIDADE .....</b>	<b>23</b>
<b>2.3</b>	<b>CÉLULAS DO SISTEMA IMUNE PERIFÉRICO .....</b>	<b>24</b>
2.3.1	MONÓCITOS .....	26
2.3.2	CÉLULAS DENDRÍTICAS .....	27
2.3.3	NEUTRÓFILOS.....	28
2.3.4	LINFÓCITOS T .....	28
2.3.5	LINFÓCITOS B .....	32
2.3.6	CÉLULAS NK .....	35
2.3.7	CÉLULAS NKT.....	36
2.3.8	EOSINÓFILOS .....	36
2.3.9	BASÓFILOS .....	36
<b>2.4</b>	<b>CITOCINAS .....</b>	<b>37</b>
<b>2.5</b>	<b>INDUÇÃO DE ALTERAÇÕES IMUNES POR AGROTÓXICOS.....</b>	<b>39</b>
<b>2.6</b>	<b>A CITOMETRIA DE FLUXO NA AVALIAÇÃO DO SISTEMA IMUNE.....</b>	<b>41</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>43</b>
<b>3.1</b>	<b>OBJETIVO GERAL .....</b>	<b>43</b>
<b>3.2</b>	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>	<b>43</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E METODOLOGIA.....</b>	<b>44</b>
<b>4.1</b>	<b>DELINEAMENTO E AMOSTRAGEM.....</b>	<b>44</b>
<b>4.2</b>	<b>ÉTICA E SUJEITOS DA PESQUISA.....</b>	<b>44</b>
<b>4.3</b>	<b>METODOLOGIA, EQUIPAMENTOS E REAGENTES .....</b>	<b>45</b>
4.3.1	PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS.....	46
<b>4.4</b>	<b>ANÁLISE DAS CÉLULAS IMUNES .....</b>	<b>50</b>



4.4.1	ANÁLISE DO TUBO 1 .....	52
4.4.2	ANÁLISE DO TUBO 2 .....	54
4.4.3	ANÁLISE DO TUBO 3 .....	55
4.4.4	ANÁLISE DO TUBO 4 .....	56
4.4.5	ANÁLISE DO TUBO 5 .....	57
4.4.6	ANÁLISE DO TUBO 6 .....	58
4.5	ANÁLISE DAS CITOCINAS .....	60
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	60
5	RESULTADOS.....	62
5.1	CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO E EXAMES LABORATORIAIS ...	62
5.1	EXAMES HEMATOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E HORMONAIS .....	63
5.2	AGROTÓXICOS UTILIZADOS .....	64
5.3	CELULARIDADE TOTAL .....	68
5.4	NEUTRÓFILOS IMATUROS E MADUROS .....	70
5.5	MONÓCITOS CLÁSSICOS, INTERMEDIÁRIOS E NÃO CLÁSSICOS .....	72
5.6	CÉLULAS DENDRÍTICAS .....	74
5.7	LINFÓCITOS T E SUAS SUBPOPULAÇÕES .....	76
5.8	LINFÓCITOS B E SUAS SUBPOPULAÇÕES .....	81
5.9	NK e NKT.....	84
5.1	CITOCINAS .....	85
5.2	CORRELAÇÕES ENTRE SUBPOPULAÇÕES DE CÉLULAS DO SI E AVALIAÇÕES BIOQUÍMICAS .....	86
6	DISCUSSÃO .....	87
7	CONCLUSÕES .....	97
	REFERÊNCIAS .....	98
	APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	112
	APÊNDICE B - QUESTIONÁRIO EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL.....	114
	APÊNDICE C – QUESTIONÁRIO HISTÓRICO CLÍNICO .....	119
	APÊNDICE D – QUESTIONÁRIO PARA CONTROLES SAUDÁVEIS .....	123

<b>ANEXO I – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP .....</b>	<b>125</b>
<b>ANEXO II – PRODUÇÃO CIENTÍFICA .....</b>	<b>128</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A exposição aos agrotóxicos e os impactos que estes podem causar tornaram-se um relevante problema ambiental e de saúde pública, visto que na última década o consumo desses produtos assumiu grandes proporções no Brasil. De acordo com o Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (AGROFIT) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), em 2014 ocorreu um pico da comercialização de agrotóxicos no país. Entre 2007 e 2014, o quantitativo passou de cerca de 623.353.689 quilos para 1.552.998.056 quilos, ou seja, um aumento equivalente a 149,14%, enquanto a área plantada aumentou de 62.338.730 para 76.246.588 hectares, o que representa um aumento de apenas 22,31%, segundo os dados do Sistema de Recuperação Automática (SIDRA) do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (BRASIL, 2016).

Outros dados do IBGE mostram que, em 2017, em Santa Catarina (SC), os agrotóxicos foram utilizados em 70,7% das propriedades rurais. O estado de SC apresenta a maior produtividade agrícola por área do país e, nesse sentido, o consumo de agrotóxicos é crescente. Os casos de intoxicação pela exposição a esses agentes também aumentaram, acompanhando o perfil de consumo e possivelmente indicando o uso incorreto e/ou excessivo de agrotóxicos pelos trabalhadores rurais no estado. O município de Santo Amaro da Imperatriz é um dos destaques na agricultura catarinense. Com área de 344.235 km<sup>2</sup> e população estimada, para 2021, de 23.907 habitantes; a cidade tem como principal atividade econômica a produção de hortifrutigranjeiros (IBGE, 2020).

Em função da ampla utilização e da variedade de agrotóxicos disponíveis, o acompanhamento dos trabalhadores que estão em contato com essas substâncias é extremamente complexo, principalmente quando são consideradas as exposições crônicas a múltiplos produtos. A literatura nacional carece de informações relacionadas ao tema, pois poucos são os grupos de pesquisa a ele dedicados. O Instituto Nacional do Câncer (INCA), órgão do Ministério da Saúde (MS), divulgou, em 2015, um documento no qual adota um posicionamento de preocupação acerca do uso de agrotóxicos no país, bem como seus efeitos sobre a saúde e a segurança alimentar e nutricional dos brasileiros (INCA, 2015).

Vários trabalhos na literatura associam a exposição aos agrotóxicos ao desenvolvimento de doenças, incluindo diversas neoplasias malignas, porém os mecanismos pelos quais elas se desenvolvem são pouco esclarecidos (ALAVANJA et al., 2014;

SCHINASI; LEON, 2014; POYNTER et al., 2017). Considerando que o sistema imune (SI) é responsável pela eliminação de células modificadas (LAKSHMI NARENDRA et al., 2013), desequilíbrios que o envolvam podem contribuir para o desencadeamento dos processos neoplásicos, além de outras doenças imunológicas (DHOUIB et al., 2016).

Diante da relevância desse tema e dos poucos estudos abordando a relação entre a exposição ocupacional aos agrotóxicos e prejuízos ao SI, o aprofundamento da pesquisa se faz necessário. Assim, com este trabalho, buscamos dar uma contribuição inicial ao assunto.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 AGROTÓXICOS: TOXICOLOGIA OCUPACIONAL

A partir da revolução industrial e da modernização da atividade agrícola, passamos a conviver com novas substâncias químicas potencialmente nocivas, incluindo os agrotóxicos (MAGALHÃES; CALDAS, 2019).

No Brasil, conforme a Lei Federal Nº 7.802, de 11 de julho de 1989 e seu decreto regulamentar Nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002, os agrotóxicos são definidos como: “produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento” (BRASIL, 2002).

Para exercer o seu efeito, os agrotóxicos devem ter uma atividade biológica que, em geral, interfere em processos enzimáticos vitais dos insetos ou das plantas daninhas através de seu antagonismo, inibição ou bloqueio. Porém, essas ações podem não estar restritas aos organismos-alvo, colocando em risco, também, a saúde humana, animal e o meio-ambiente. Os trabalhadores com exposição ocupacional, especialmente os agricultores, constituem a população em situação mais crítica, já que os graus de exposição a esses produtos são maiores quando comparados aos da população geral (MAGALHÃES; CALDAS, 2019).

As características físico-químicas e a forma como o agrotóxico é aplicado são importantes para avaliar o grau de exposição. Quanto mais volátil o produto, maior é o seu potencial de concentração de vapores. A forma de manuseio também é preocupante, pois geralmente o líquido é borrifado, e, assim há o aumento da área de evaporação, o qual é representado pela grande superfície resultante da soma da superfície das gotículas em contato com o ar e, quanto maior a superfície de líquido exposta ao ambiente, maior o potencial de exposição (BUSCHINELLI, 2020).

Classicamente, intoxicações por agrotóxicos podem ser divididas em agudas (exposição em um único episódio ou por um curto espaço de tempo) e crônicas (exposições

repetidas por muitos meses ou anos). As intoxicações agudas podem ser do tipo leve, moderada ou grave, conforme a seguir:

- Intoxicação aguda leve: quadro clínico caracterizado por cefaleia, irritação cutâneo-mucosa, dermatite de contato irritativa ou por hipersensibilização, náusea e discreta tontura;
- Intoxicação aguda moderada: quadro clínico caracterizado por cefaleia intensa, náusea, vômitos, cólicas abdominais, tontura mais intensa, fraqueza generalizada, parestesias, dispneia, salivação e sudorese aumentadas;
- Intoxicação aguda grave: quadro clínico grave, caracterizado por miose, hipotensão, arritmias cardíacas, insuficiência respiratória, edema agudo de pulmão, pneumonite química, convulsões, alterações da consciência, choque, coma, podendo evoluir para a morte (BRASIL, 2006).

Distintamente, intoxicações crônicas por agrotóxicos caracterizam-se por quadros clínicos muitas vezes indefinidos e inespecíficos, além de irreversíveis em alguns casos. Esses diagnósticos são complexos, pode haver maior dificuldade na associação causa/efeito, principalmente quando há exposição a múltiplos produtos, situação que caracteriza a agricultura brasileira e os sujeitos deste estudo. Em geral, as exposições ocupacionais crônicas são as que causam mais doenças nos trabalhadores (BRASIL, 2006).

No tocante à classificação dos agrotóxicos, diversos critérios são considerados. Eles podem ser agrupados quanto à finalidade ou organismo-alvo a ser controlado, ao seu grau de toxicidade ou ao grupo químico a que pertencem.

Quanto à sua finalidade ou organismo-alvo, os agrotóxicos podem ser classificados em:

- Inseticidas: agrotóxicos que têm ação letal em insetos;
- Fungicidas: agrotóxicos com ação sobre fungos;
- Herbicidas: ação de controle às plantas consideradas daninhas ou invasoras, em especial, na agropecuária;
- Desfolhantes: agrotóxicos com efeito desfolhante, ou seja, aquele que em contato com as plantas, induzem a queda prematura das folhas;
- Fumigantes: agrotóxicos com ação sobre fauna e flora, que tem sua ação promovida por meio de gases;

- Rodenticidas/raticidas: agrotóxicos com ação letal em roedores;
- Moluscicidas: agrotóxicos com ação em moluscos terrestres ou aquáticos;
- Nematicidas: agrotóxicos com ação em nematoides;
- Acaricidas: agrotóxicos com ação em ácaros (PARANÁ, 2018).

Quanto à classificação por toxicidade, desde 2019 a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) adotou os padrões do Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (do inglês, *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals* – GHS) (ANVISA, 2019). Com isso, os órgãos governamentais do Brasil alegam que o país passará a ter regras harmonizadas como as de países da União Europeia e da Ásia, dentre outros, fortalecendo a comercialização de produtos nacionais no exterior. Atualmente, existem cinco categorias de toxicidade, conforme a Figura 1.

**Figura 1.** Classificação toxicológica dos agrotóxicos adotada pela ANVISA em 2019.

Categoria		Cat 1	Cat 2	Cat 3	Cat 4	Cat 5	Não classificado
Nome da categoria		Extremamente Tóxico	Altamente Tóxico	Moderadamente tóxico	Pouco tóxico	Improvável de Causar Dano Agudo	Não classificado
Via de exposição Oral (mg/kg p.c.)		≤ 5	>5 - 50	>50 - 300	>300 - 2000	>2000 - 5000	> 5000
Via de exposição Cutânea (mg/kg p.c.)		≤ 50	>50 - 200	>200 - 1000	>1000 - 2000	>2000 - 5000	> 5000
Via de exposição Inalatória	Gases (ppm/V)	≤ 100	>100 - 500	>500 - 2500	>2500 - 20000	>20000	
	Vapores (mg/L)	≤ 0,5	> 0,5 - ≤ 2,0	>2,0 - ≤ 10	> 10 ≤ 20	> 20	
	Produtos sólidos e líquidos (mg/L)	≤ 0,05	>0,05 - 0,5	>0,5 - 1,0	>1,0- 5,0	> 5,0	

Fonte: (ANVISA, 2019).

Quanto aos grupos químicos a que pertencem, a classificação dos agrotóxicos é bastante extensa. A seguir, alguns exemplos:

- Organofosforados (OF): são derivados dos ácidos contendo fósforo em sua molécula (ácidos fosfóricos, tiofosfórico, e ditiofosfórico). São mais comumente utilizados como inseticidas e acaricidas agrícolas. Alguns exemplos são os inseticidas à base de malation, clorpirifós, temefós, acefato, fenitroton, paration e metamidofós;
- Carbamatos (CBM): são derivados do ácido carbâmico. O uso doméstico é comum como, por exemplo, dos inseticidas carbofuram e aldicarbe;
- Piretroides: são derivados sintéticos das piretrinas naturais, encontradas em extratos vegetais, como os extraídos das flores de *Chrysanthemum cinerariaefolium*. São exemplos de piretroides sintéticos os inseticidas como a deltrametrina, cipermetrina, lambdacialotrina e permetrina;
- Glicina substituída - (N-fosfonometil glicina): desenvolvido com a finalidade de ser um herbicida sistêmico não seletivo, utilizado comumente em agricultura, associados ou não a sementes transgênicas e em ambientes domésticos. O princípio ativo é denominado glifosato;
- Bipyridilos: são compostos que atuam por meio da formação de radicais livres com o oxigênio; utilizados comumente como herbicidas, sendo paraquate o principal exemplo;
- Ditiocarbamatos: pertencem a um grupo de agrotóxicos organossulfurados de ação fungicida, tais como mancozeb e tiram;
- Dinitrofenóis: herbicidas que atuam promovendo o déficit energético desacoplando as ligações da adenosina trifosfato (ATP). Como exemplo, temos os 2,4-D e 2, 4, 5-T (BRASIL, 2016).

Contudo, o modo de ação tóxica desses produtos em humanos talvez seja o conhecimento de maior importância. Em um eventual atendimento médico a um caso suspeito de intoxicação, o conhecimento sobre efeitos biológicos como neurotoxicidade (por bloqueio do fechamento dos canais de sódio; por inibição de colinesterases; ou por ação agonista no sistema gabaérgico ou no sistema nicotínico), ação anticoagulante, etc. pode ser muito útil, pois definirá melhor os possíveis sinais e sintomas apresentados pelo indivíduo, facilitando o diagnóstico e o tratamento (BROWN, 2010).



## 2.2 O SISTEMA IMUNE NA RESPOSTA À TOXICIDADE

Dentre os vários sistemas afetados pela exposição ocupacional a agrotóxicos, o SI é aquele com mais efeitos deletérios, pois é ligado intimamente a outros sistemas como o reprodutivo, nervoso, endócrino, cardiovascular e respiratório. Portanto, qualquer perturbação no SI também pode levar a distúrbios nesses outros sistemas. As concentrações dos agrotóxicos, a duração da exposição, além de fatores individuais como idade, gênero, nutrição e genética são determinantes nos danos resultantes dessa exposição (MOKARIZADEH et al., 2015).

Estudos em animais têm demonstrado significativa disfunção imunológica após exposição pontual a altas concentrações de agrotóxicos e após baixas concentrações por longos períodos. Entretanto, se a exposição ocorrer no período embrionário, durante a formação do SI, até mesmo baixas concentrações de agrotóxicos por curtos períodos podem causar danos sérios e permanentes. No período pós-natal, o SI continua vulnerável, pois a imunidade humoral se desenvolve somente poucos anos após o nascimento. As vias de sinalização intracelulares e extracelulares, que controlam o equilíbrio entre a ativação, inibição e regulação das respostas imunes, permanecem vulneráveis por toda a vida (CORSINI et al., 2013).

Segundo Mokarizadeh e colaboradores (2015), o estilo de vida não saudável pode proporcionar um microambiente para a imunotoxicidade. A privação de sono, a desidratação crônica, o sedentarismo, o estresse, o fumo, o consumo excessivo de álcool, além da exposição exagerada aos raios ultravioleta podem acarretar imunossupressão (MOKARIZADEH et al., 2015). A nutrição tem um papel importante na atividade enzimática para a manutenção de um SI funcional. Concentrações inadequadas de proteínas, vitaminas e microelementos podem levar a supressão da atividade imunológica e de enzimas envolvidas no metabolismo de xenobióticos e antioxidantes (FURST, 2002; LUEBKE, 2002; MOKARIZADEH et al., 2015). A ativação de genes codificantes das enzimas que biotransformam xenobióticos também constitui um importante fator de suscetibilidade individual aos efeitos da exposição aos agrotóxicos. Polimorfismos genéticos podem levar à maior ou menor atividade enzimática, causando alterações na formação de produtos de biotransformação tóxicos e provocar variações quanto às concentrações de agrotóxicos que produzirão efeitos indesejáveis (COSTA, L. G. et al., 2005; RICHTER; JARVIK;

FURLONG, 2009; AGUILAR-GARDUNO et al., 2013). Variações genéticas na produção de citocinas e no complexo principal de histocompatibilidade (MHC) também contribuem para as variações individuais de imunotoxicidade (TURNER et al., 2011).

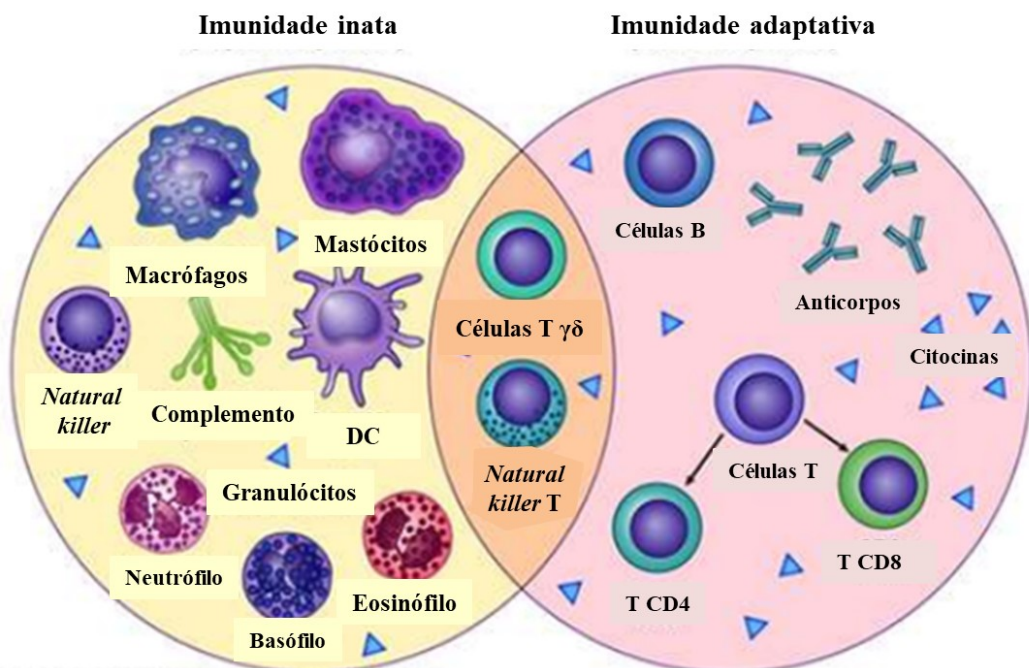
### 2.3 CÉLULAS DO SISTEMA IMUNE PERIFÉRICO

O SI é composto por células e tecidos que se comunicam por meio de citocinas e por contato direto, o que resulta em uma rede dinâmica especializada em tipos específicos de respostas. Como em qualquer sistema complexo, a função do SI não pode ser prevista a partir do comportamento de nenhuma de suas partes separadamente, pois é dependente do contexto e envolve centenas de componentes (FURMAN; DAVIS, 2015). Por mais de um século, o SI foi identificado somente como um fator de proteção contra doenças infecciosas. As definições atuais ainda são amplamente influenciadas por essas observações iniciais, e o sistema imunológico é comumente apresentado como um mecanismo de defesa composto por respostas inatas e adaptativas. No entanto, a defesa do hospedeiro é apenas uma face da função geral do SI na manutenção da homeostase do tecido e da integridade do sistema. De fato, o SI é parte integrante dos processos fisiológicos fundamentais, como desenvolvimento, reprodução e cicatrização de feridas, e a proximidade entre esse e outros sistemas corporais tem sido amplamente demonstrada (JULIER et al., 2017; NELSON; LENZ, 2017; SATTLER, 2017; NEGISHI et al., 2018).

O SI, como mencionado, é tradicionalmente dividido em componentes principais da imunidade inata e adaptativa, conforme ilustrado na Figura 2. A imunidade inata consiste em mecanismos de defesa estrutural celular, bioquímica e física que respondem rapidamente após eventos desencadeados pelo contato com micro-organismos patogênicos ou células com ácido desoxirribonucleico (DNA) danificado. As células que fazem parte dos componentes da imunidade inata como as células dendríticas (DCs), monócitos, macrófagos, neutrófilos, mastócitos, células *natural killer* (NK) e células *natural killer* T (NKT), representam a primeira linha de defesa contra agentes estranhos, comunicando-se por meio de citocinas e quimiocinas. A imunidade adaptativa, que consiste em linfócitos T, linfócitos B e seus mediadores humorais, incluindo citocinas e anticorpos, alcança uma excelente especificidade antigênica pelo rearranjo somático dos genes receptores de antígeno de cada linhagem de linfócitos: receptor de células T (TCR, do inglês *T Cell Receptor*) para linfócitos T e imunoglobulina (Ig) para os linfócitos B (LAKSHMI NARENDRA et al., 2013). Portanto,

deficiências nesse maquinário complexo podem causar danos em outros mecanismos. As condições clínicas resultantes dependem do tipo específico de defeito imunológico subjacente. Por exemplo, infecções bacterianas podem se manifestar quando as células B apresentam distúrbios, enquanto infecções por vários outros patógenos (por exemplo, vírus e fungos) caracterizam a imunodeficiência combinada de células T e B (FRAZÃO; ERRANTE; CONDINO-NETO, 2013). Características atópicas como asma, dermatite atópica e alergias alimentares podem ser observadas em alguns pacientes com disfunção das células T. A desregulação imune também pode se manifestar como granulomas cutâneos, respiratórios ou gastrointestinais. (RAJE; DINAKAR, 2015). Desequilíbrios como a autoimunidade podem causar desde citopenia autoimune secundária a defeitos das células B até Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES), que está relacionado a transtornos do sistema complemento (CHENG; ANDERSON, 2012). Embora o linfoma e a leucemia sejam as neoplasias mais comuns quando as imunodeficiências estão presentes, outros tipos de malignidades também podem ser observados (RAJE; DINAKAR, 2015; DE JONG et al., 2017).

**Figura 2.** Imunidade inata e adaptativa.



Os mecanismos da imunidade inata fornecem a defesa inicial contra infecções. As respostas imunes adaptativas se desenvolvem mais tarde e necessitam de ativação de linfócitos. Fonte: adaptado de (DRANOFF, 2004).

### 2.3.1 MONÓCITOS

Os monócitos se originam de células-tronco hematopoiéticas na medula óssea e compreendem cerca de 10% dos leucócitos no sangue periférico (SP) em humanos. Os monócitos ativados atuam na imunidade inata durante as respostas inflamatórias e patogênicas por meio da fagocitose e liberação citocinas e vários outros mediadores. Além disso, os monócitos também participam da imunidade adaptativa como células apresentadoras de antígenos (APCs) (LEE, J. et al., 2017).

Os monócitos e os macrófagos pertencem à mesma linhagem de células, mas em dois estágios sequenciais de um processo de diferenciação. Os monócitos circulam no SP e, eventualmente, migram para os tecidos, onde realizam a sua diferenciação terminal em macrófagos. Por sua vez, os macrófagos são células com extrema plasticidade e adquirem diferentes tipos morfológicos (macrófagos alveolares, células de *Kupffer*, macrófagos mesangiais, histiócitos etc.) de acordo com o microambiente em que se encontram. Os macrófagos possuem uma alta capacidade de adesão, migração e fagocitose, são capazes de digerir bactérias, complexos imunes, detritos e micropartículas e, além disso, tais células são particularmente ativas nas barreiras corporais (como pulmão, intestino e pele). Os monócitos e os macrófagos são biossensores altamente sensíveis a diferentes padrões moleculares associados a patógenos e resíduos de tecidos danificados por meio de seus receptores ancestrais *Toll Like Receptors* (TLR) e moléculas relacionadas. Sua ativação induz uma produção rápida de citocinas e quimiocinas em diversos padrões, de acordo com os respectivos riscos. As citocinas regulam localmente a reação inflamatória, enquanto as quimiocinas atraem e estimulam novos efetores. Essas células também contribuem substancialmente para a resposta imune adaptativa pela apresentação do antígeno às células T com uma orquestração da reação imune (CASTAGNA et al., 2012; LAMBERT; SACK, 2017).

Os monócitos circulantes são classicamente caracterizados por sua expressão de CD14, um receptor de lipopolissacarídeos. No entanto, a maturação tardia de monócitos periféricos é acompanhada pela expressão de CD16, um receptor de imunoglobulina, e pelo declínio simultâneo de sua expressão de CD14 em um pequeno subconjunto dessas células. Baseado nesses achados, os monócitos humanos foram divididos em três populações principais: monócitos clássicos (cMos) (CD14<sup>+</sup> CD16<sup>-</sup>); monócitos intermediários (iMos) (CD14<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup>) e monócitos não clássicos (ncMos) (CD14<sup>dim</sup> CD16<sup>+</sup>) (KAPELLOS et al.,

2019). O local de maturação dessas células, isto é, se ocorre na corrente sanguínea ou fora dela, ainda é objeto de debate. Porém, a maior parte dos estudos apoia a hipótese de que a diferenciação dos cMos em iMos e ncMos ocorra mais provavelmente fora do compartimento sanguíneo (DAMASCENO et al., 2019).

### 2.3.2 CÉLULAS DENDRÍTICAS

O início e o controle das respostas imunes dependem das DCs, uma classe de APCs derivadas da medula óssea encontradas no sangue, tecidos e órgãos linfoides. As DCs formam uma interface essencial entre a detecção inata de patógenos e a ativação da imunidade adaptativa. Essa tarefa requer uma ampla gama de mecanismos e respostas e, assim, as DCs são subdivididas em: DCs plasmocitoides (pDCs) ( $CD11c^- CD123^+$ ) e DCs mieloides (mDCs) ( $CD11c^{++} CD123^-$ ) (COLLIN; BIGLEY, 2018).

As pDCs são produzidas continuamente na medula óssea e emergem como células maduras na periferia, onde permanecem não proliferativas e têm uma vida útil relativamente curta, de alguns dias (ZHAN et al., 2016). As propriedades essenciais das pDCs são definidas como: morfologia secretória "plasmocitoide" semelhante a dos plasmócitos; produção rápida e maciça de interferon (IFN) do tipo I em resposta a vírus e alta expressão de MHC II que é essencial na apresentação de antígenos às células T  $CD4^+$ . As pDCs também produzem IFN do tipo III (IFN- $\lambda$ ) e citocinas adicionais, como, por exemplo, o fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$ , além de quimiocinas (REIZIS, 2019).

Já as mDCs são capazes de induzir respostas dos linfócitos T  $CD8^+$  devido ao seu papel na apresentação de antígenos capturados no meio extracelular via MHC I. Essa função é essencial para a erradicação de tumores e de muitos vírus (O'KEEFFE; MOK; RADFORD, 2015). Ao interagir com células T, as mDCs podem induzir sua diferenciação em diferentes subconjuntos. Essa diferenciação de células T em cada subtipo é um fenômeno complexo, que pode ser influenciado pelas citocinas no tecido de origem das mDCs, pelo seu estado de maturação e pela causa do desequilíbrio tecidual. No entanto, esses processos não estão completamente elucidados (PATENTE et al., 2018).

### 2.3.3 NEUTRÓFILOS

Os neutrófilos compreendem um subtipo de leucócito polimorfonuclear bem reconhecido como um dos principais atores durante a inflamação aguda. Em condições fisiológicas, os neutrófilos podem ser encontrados na medula óssea, baço, fígado e pulmão (KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013). Como células efetoras do SI, estão abundantemente presentes na circulação e compreendem de 50 a 70% do total de leucócitos circulantes em humanos (LELIEFELD et al., 2016).

Os neutrófilos fazem parte da primeira linha de defesa contra injúrias e contêm um repertório de funções efetoras antimicrobianas, que incluem fagocitose, degranulação e formação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NET) (LIEW; KUBES, 2019). Os macrófagos e os mastócitos residentes nos tecidos agem como células sentinelas que iniciam o recrutamento de neutrófilos, e, dessa forma, controlam e induzem vários processos fisiopatológicos, como o aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos locais e a liberação de quimiocinas (KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013). No SP, em condições normais, são encontrados neutrófilos maduros circulando, e, esses podem ser identificados com base na expressão da molécula CD16. Porém, nos casos de inflamação ou infecções, ocorre o aumento do recrutamento dos neutrófilos a partir da medula óssea e, nesses casos, podem-se detectar neutrófilos imaturos no SP, sendo a identificação dos mesmos independente da expressão de CD16 (CHERIAN et al., 2010).

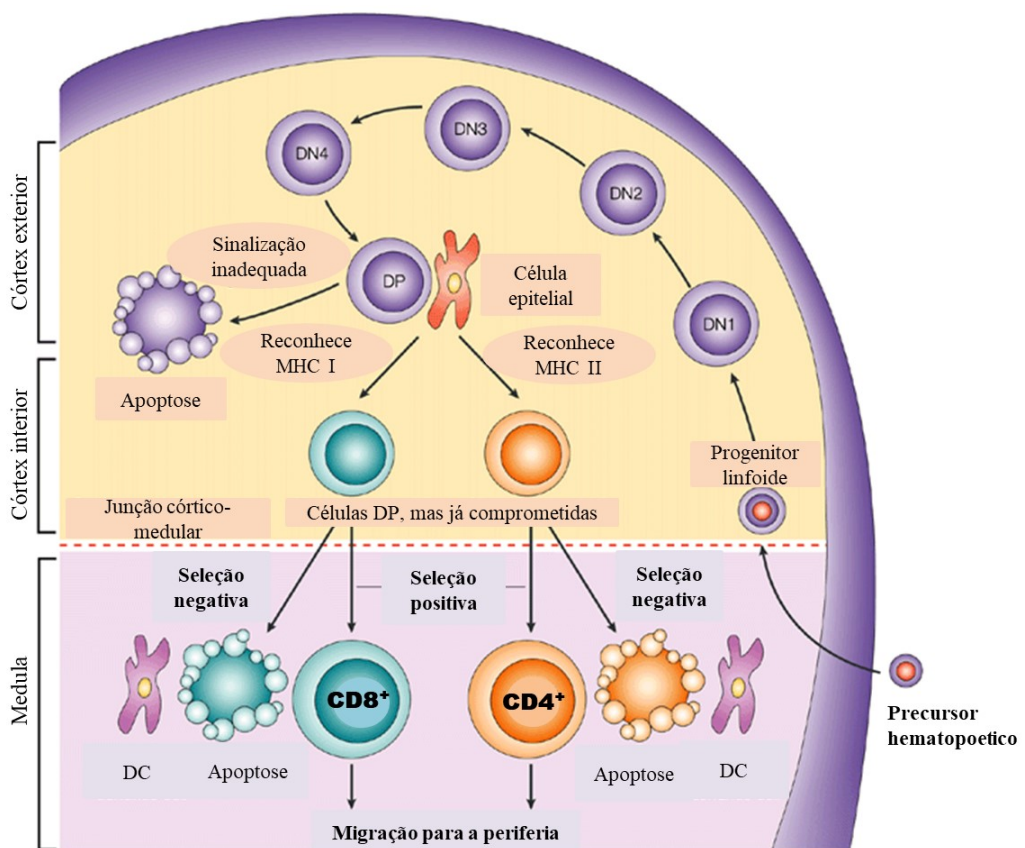
Na última década, estudos apontam o envolvimento dos neutrófilos também na imunidade adaptativa, pelo controle da ativação das células T e B, e pela apresentação de antígenos às APCs nos linfonodos (KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013). O papel dos neutrófilos nas infecções é bem estabelecido, mas seu papel em outras respostas imunes inatas, na imunidade adaptativa e funções homeostáticas ainda merecem mais estudos (LEY et al., 2018).

### 2.3.4 LINFÓCITOS T

Os linfócitos T são caracterizados por marcadores de superfície celular que definem sua função. As células T expressam tipicamente o TCR, que é composto pela molécula CD3. No timo, o local de maturação das células T, os linfócitos T CD3<sup>+</sup> passam a expressar também as moléculas de superfície CD4 e CD8. A maior parte dos linfócitos T permanece

expressando somente a molécula CD4 e são denominados células T auxiliares (Th, do inglês *T helper*). Quando os linfócitos expressam somente a molécula CD8, são denominados linfócitos T citotóxicos (CTLs, do inglês *Cytotoxic T Lymphocytes*). Algumas células permanecem CD4 e CD8 duplamente positivas (DP) e outras se tornam duplamente negativas (DN), ou seja, perdem a expressão de ambas as moléculas (GERMAIN, 2002). A Figura 3 mostra a maturação dos linfócitos T no timo.

**Figura 3.** Maturação das células T no timo.



Os precursores das células T migram da medula óssea até o timo pela corrente sanguínea. No córtex do timo, os progenitores das células T  $\alpha\beta$  expressam TCR e os correceptores CD4 e CD8 (DP). A diferenciação funcional e fenotípica para células T  $CD4^+ CD8^-$  ou T  $CD8^+ CD4^-$  ocorre na medula do timo, e as células T maduras são liberadas na circulação periférica. Fonte: adaptado de (GERMAIN, 2002).

As moléculas CD4 e CD8 são, portanto, correceptoras do TCR que se ligam a moléculas MHC de classe II e I, respectivamente, quando essas são apresentadas pelas APCs. Após a ativação com um antígeno restrito ao MHC I, as células T  $CD8^+$  *naïve* se diferenciam

em CTLs, as quais secretam TNF- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , perforinas e granzimas B. As perforinas criam poros nas membranas das células alvo, por meio das quais as granzimas podem entrar e induzir apoptose, exercendo, assim, sua atividade citolítica. (ELLMIEIER; HAUST; TSCHISMAROV, 2013).

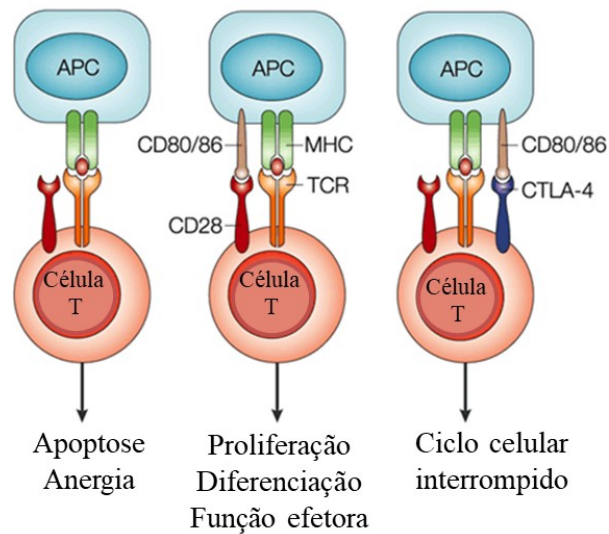
Em resposta ao estímulo combinado de antígeno restrito ao MHC II e citocinas particulares, as células T CD4<sup>+</sup> *naïve* se diferenciam em células efetoras Th1 (produtora de IFN- $\gamma$ ), Th2 (produtora de interleucina (IL)-4) e Th17 (produtora de IL-17), ou ainda em células T reguladoras (T<sub>REG</sub>), as quais produzem as suas próprias citocinas e medeiam funções diferentes (SCHIFFRIN, 2014).

As células T<sub>REG</sub> são importantes na auto tolerância e homeostase imunológica, pois têm a capacidade de suprimir respostas imunes inatas e adaptativas a autoantígenos, aloantígenos, antígenos tumorais e agentes infecciosos (VIGNALI; COLLISON; WORKMAN, 2008). Essas células expressam a subunidade  $\alpha$  (CD25) do receptor IL-2 e o fator de transcrição *Forkhead Box P3* (FoxP3). As ações supressivas das T<sub>REG</sub> são mediadas por mecanismos de contato celular e/ou pela liberação de citocinas anti-inflamatórias IL-10, IL-35 e fator transformador de crescimento (TGF) - $\beta$  (SCHIFFRIN, 2014).

Durante a ativação das células T *naïve*, além da interação entre o TCR e o MHC das APCs, também há a interação entre o receptor CD28 das células T e os receptores CD80 e CD86 das APCs. Por isso, a molécula CD28 é utilizada como marcador de ativação das células T (BERNARD; LAMY AND; ALBERTI, 2002). A Figura 4 ilustra a interação molecular entre APCs e células T.



**Figura 4.** Função da molécula CD28 na interação entre APCs e células T.



A molécula CD28 é utilizada como marcador de ativação das células T. As APCs em repouso não expressam co-estimuladores e não ativam células T *naïve*. Micro-organismos e citocinas produzidos durante a resposta imune inata ativam as APCs e elas passam a expressar co-estimuladores, tais como as moléculas CD80/86. Assim, as APCs tornam-se capazes de ativar as células T *naïve*. As APCs ativadas também produzem citocinas como IL-2, que estimula a diferenciação de células T *naïve* em células efetoras. Fonte: adaptado de (ALEGRE; FRAUWIRTH; THOMPSON, 2001).

Além das APCs, as células T no SP também podem apresentar moléculas de MHC II em sua superfície externa, e o número dessas células aumenta com a ativação. Um dos três isotipos de MHC II humanos, denomina-se antígeno leucocitário humano (HLA) – DR, o qual também é frequentemente utilizado como marcador de ativação de células T, juntamente com outras moléculas, como CD25 e CD69 (REVENFELD et al., 2016).

Já está bem estabelecido que os estágios finais da diferenciação das células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> são marcados pela expressão da molécula CD57. Sabe-se, também, que as células T CD4<sup>+</sup> CD57<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> CD57<sup>+</sup> não possuem capacidade proliferativa e que estão aumentadas em frequência com a ativação imune crônica (KARED et al., 2016).

No SP, as células T podem apresentar quatro estágios de diferenciação, de acordo com a expressão de alguns antígenos receptores de homoenxertos como CD62L, CCR7 ou CD197 (que permitem a entrada nos órgãos linfoides) e CD45 RA. As células T *naïve* deixam o timo e atingem a circulação apresentando o fenótipo CD62L<sup>+</sup> CCR7<sup>+</sup> CD45 RA<sup>+</sup>. Após a ativação, algumas células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> tornam-se células T de memória central (T<sub>CM</sub>, do inglês, *Central Memory*) que podem ser reativadas após interação subsequente com antígeno

previamente encontrado (DEVARAJAN; CHEN, 2013). As  $T_{CM}$  são  $CD62L^+ CCR7^+ CD45RA^-$  e já são encontradas nos órgãos linfoides secundários. As  $T_{CM}$  produzem IL-2 e são consideradas células de memória de longa duração, com baixa capacidade efetora, mas alto potencial de proliferação, pois sua expansão deve dar origem às células T efetoras de memória ( $T_{EM}$ , do inglês, *Effector Memory*). Comparadas às células  $T_{CM}$ , as células  $T_{EM}$  ( $CD62L^- CCR7^- CD45RA^-$ ) possuem vida relativamente curta, com menor potencial de proliferação, mas realizam uma gama de funções como a produção de  $IFN-\gamma$ , e encontram-se predominantemente nos tecidos alvo de infecção. Após a eliminação da infecção, a maioria das células  $T_{EM}$ , geradas pela expansão clonal, morrem. Mas, ao longo do processo, algumas células ativadas por antígenos voltam a expressar  $CD45RA$  e tornam-se células T efetoras de memória  $RA$  ( $T_{EMRA}$ , do inglês, *Effector Memory  $CD45RA^+$* ). Elas estão em estado de prontidão, com alta capacidade para responder a reexposição aos antígenos nos tecidos muito mais rapidamente do que as células  $T_{CM}$ , porém essas últimas podem dar origem a uma resposta efetiva do SI mesmo décadas após a exposição inicial (SALLUSTO et al., 2000; AHLERS; BELYAKOV, 2010; GEGINAT et al., 2013).

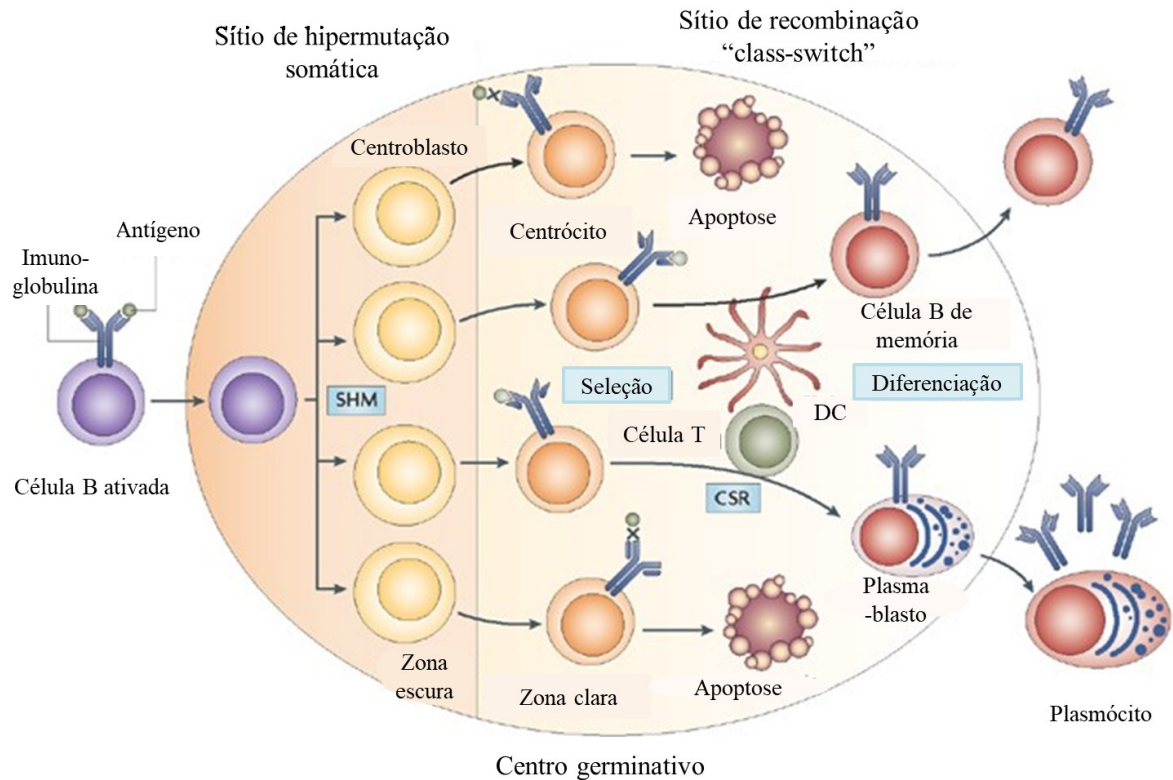
### 2.3.5 LINFÓCITOS B

Os linfócitos B, assim como os linfócitos T, também expressam um receptor específico na superfície celular, o receptor de células B (BCR, do inglês *B Cell Receptor*) e, além dele, um complexo proteico correceptor composto por CD19, CD21 e CD81. Porém, diferente dos linfócitos T, as células B possuem a capacidade de reconhecer antígenos em suas formas nativas, sem a necessidade de interação com as APCs. Quanto a sua maturação, essa ocorre em duas etapas, as quais estão localizadas em tecidos diferentes, como segue: (i) a diferenciação de precursores de células B de uma célula-tronco hematopoiética para linfócitos B maduros *naïve* ocorre na medula óssea e (ii) a maturação das células de memória/efetoras ocorre nos órgãos linfoides secundários. O tráfego de células B resultantes entre esses tecidos através do SP reflete o *status* imunológico de um indivíduo, além de possíveis distúrbios do desenvolvimento de células B, autoimunidade e doenças linfoproliferativas relacionadas à biologia e homeostase das células B (PEREZ-ANDRES et al., 2010).

As células B *naïve* com características fenotípicas maduras (dentre elas, expressão de CD20) e um BCR totalmente funcional, deixam a medula óssea, e, através dos vasos sanguíneos, atingem o SP e recirculam entre os órgãos linfoides secundários. Em condições

basais, cerca de 60-70% das células B circulantes são *naïve*. Essas células entram nos linfonodos pela zona de células T e, se nesse local não encontrarem um antígeno, retornam ao SP recirculando pelos tecidos linfoides por mais alguns dias, até sofrerem apoptose. No entanto, se as células B *naïve* encontrarem seu antígeno cognato, o qual é apresentado pelas APCs e pelas células T ativadas, elas também serão ativadas e migrarão para o centro germinativo (CG). No CG, as células B permanecem migrando continuamente entre a zona escura e a zona clara. Na zona escura, as células sofrem proliferação rápida, hipermutação somática e recombinação de troca de classes de Ig; na zona clara, elas reencontram o antígeno para verificar se os eventos anteriores levaram a uma afinidade de BCR aumentada para o mesmo (maturação por afinidade). Esse processo resulta na sobrevivência e proliferação de clones de células B com um BCR de alta afinidade para o antígeno, ou seja, células B de memória (BM). Por outro lado, as próprias células B podem apresentar antígenos por meio da molécula MHC II expressa em sua superfície para os linfócitos Th, sem haver a necessidade de interação com APCs clássicas (MCHEYZER-WILLIAMS; MCHEYZER-WILLIAMS, 2004; ALLEN; OKADA; CYSTER, 2007; PEREZ-ANDRES et al., 2010). A Figura 5 esquematiza esses eventos.

**Figura 5.** Esquema ilustrando a diferenciação das células linfoides B.



Fases da diferenciação das células B. A diferenciação das células B é iniciada na medula óssea e termina nos órgãos linfoides secundários. Os antígenos e outros estímulos, incluindo as células Th, estimulam a proliferação e a diferenciação de clones específicos de células B. O clone pode se diferenciar em plasmócitos que produzem imunoglobulinas ou pode persistir como células de memória. Fonte: adaptado de (KLEIN; DALLA-FAVERA, 2008).

As BM constituem cerca de 20 a 30% das células B no SP. Cerca de 50% das BM, após a troca de classes de Ig no CG, perdem a expressão de IgD e IgM e passam a expressar outras Ig como IgG ou IgA. Essas populações são denominadas de células B de memória *class switched* (BM-CS). Os outros 50% das células B de memória permanecem co-expressando IgD e IgM ou somente IgM, e assim são denominadas células B de memória *non switched* (BM-NS) (PEREZ-ANDRES et al., 2010).

Aproximadamente 96% das BM que tiveram contato com antígenos proteicos em uma resposta T-dependente expressam a molécula CD27 na sua superfície. O restante dessas células não expressa CD27, e são denominadas células B de memória duplo-negativas (BM-DN). Especula-se que nesses casos ocorra interação com antígeno de maneira T-independente, fora do CG (FECTEAU; CÔTÉ; NÉRON, 2006; BERKOWSKA et al., 2011). O último estágio de diferenciação das células B é representado pelos plasmablastos, que correspondem

a cerca de 1 a 3% da população B circulante. No SP, os plasmablastos podem ser identificados por uma forte expressão da molécula CD38, fraca expressão de CD19 e expressão heterogênea de CD20. Essas são células formadas a partir das células BM e que atingem o SP no seu caminho do tecido linfóide à medula óssea, ao MALT, ou a tecidos inflamados, onde completam sua diferenciação em plasmócitos. Os plasmócitos não possuem mais capacidade de proliferação e são caracterizados pela alta capacidade secretória de anticorpos antígeno-específicos (PEREZ-ANDRES et al., 2010; SHERWOOD, 2018).

### 2.3.6 CÉLULAS NK

As células NK são células grandes e granulares, que derivam da medula óssea e participam do sistema de vigilância tumoral, além de reconhecer e eliminar células infectadas por vírus. Com base na morfologia, na expressão de muitos marcadores linfóides e na sua origem de uma célula progenitora linfóide comum na medula óssea, as células NK são tratadas como um subtipo de linfócito. Essas células são consideradas componentes da defesa imunológica inata por não possuírem receptores específicos para antígenos em sua superfície celular. Devido a esse fenótipo, as células NK possuem a capacidade de montar uma resposta imune inata rápida e inespecífica contra as células tumorais e células infectadas por patógenos intracelulares (GUO et al., 2018). Elas compreendem entre 5 e 15% das células mononucleares do SP e também estão presentes nos tecidos, como o fígado, o baço, o pulmão e a medula óssea.

As células NK são produtoras de citocinas como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 e fatores de crescimento, como o fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF). As informações da última década são de que a citotoxicidade mediada pelas células NK e a produção de citocinas impactam as DCs, macrófagos e neutrófilos, e conferem às NK uma função reguladora que afeta as respostas das células T e B específicas do antígeno. Fenotipicamente, as células NK se caracterizam pela perda da expressão da molécula CD3/TCR e pela expressão de CD56, uma molécula de adesão envolvida na interação entre as células NK e as células-alvo (OBOSHI et al., 2016).

A atividade citolítica das NK parece estar confinada principalmente ao subconjunto mais maduro que expressa a molécula CD16, enquanto a produção de citocinas é geralmente atribuída às células mais imaturas CD16 (+/-) (BÉZIAT et al., 2011; DE MARIA et al., 2011).

Este último subtipo é raro no SP, mas predominante em linfonodos e outros tecidos (BÉZIAT et al., 2011).

### 2.3.7 CÉLULAS NKT

As células NKT constituem um subconjunto de células T que se encontram na interface entre imunidade inata e adaptativa. Assim como as células T convencionais, as NKT expressam o TCR composto pela molécula CD3, mas também marcadores tipicamente associados às NK como o CD56 (KRIJGSMAN et al., 2019). Em muitos estudos, a coexpressão de CD3 e CD56 é usada para identificar as NKT (JIANG et al., 2014; KRIJGSMAN; HOKLAND; KUPPEN, 2018). Essas células compreendem aproximadamente 5 a 15% do *pool* de células T periféricas (JIANG et al., 2014). Apesar de possuírem capacidade citotóxica, as células NKT exercem seu papel principalmente pela secreção de grandes quantidades de citocinas pró ou anti-inflamatórias após sua ativação, que resulta em amplificação ou redução da resposta imune, atuando com células reguladoras (KRIJGSMAN; HOKLAND; KUPPEN, 2018). Ao contrário das células T convencionais, apenas um pequeno subconjunto de NKT trafega através dos órgãos linfoides secundários em condições homeostáticas. Nessas condições, as maiores populações de células NKT estão localizadas no fígado, pulmões e medula óssea (SLAUENWHITE; JOHNSTON, 2015).

### 2.3.8 EOSINÓFILOS

Os papéis que os eosinófilos desempenham na saúde e na doença continuam a evoluir. Acreditava-se que os eosinófilos apenas desempenhavam um papel primário na defesa do hospedeiro contra helmintos e atuavam nas condições alérgicas. No entanto, cada vez mais, os eosinófilos estão centralmente posicionados nas redes imunes e inflamatórias, possuindo receptores para uma série de mediadores inflamatórios e capazes de produzir numerosos mediadores pró-inflamatórios e homeostáticos (CHUSID, 2018).

### 2.3.9 BASÓFILOS

Os basófilos foram negligenciados por muito tempo em estudos imunológicos, devido ao seu pequeno número e à semelhança fenotípica com mastócitos residentes em tecidos.

Porém, o desenvolvimento recente de ferramentas analíticas lançou uma nova luz sobre essa minoria negligenciada e revelou papéis distintos daqueles dos mastócitos em várias respostas imunes. A função primária dos basófilos parece ser a proteção contra infecções por parasitas, incluindo e helmintos. É por isso que os basófilos são evolutivamente bem conservados em muitas espécies animais, embora em pequeno número (KARASUYAMA; YAMANISHI, 2014).

## 2.4 CITOCINAS

As citocinas são pequenas moléculas solúveis de natureza polipeptídica e glicoproteica, com tamanho de aproximadamente 40 kDa. Trata-se de mediadores envolvidos em praticamente todas as respostas imunes e inflamatórias, que incluem a imunidade inata, apresentação de antígenos, diferenciação, recrutamento e ativação celular e expressão de moléculas de adesão, participando do controle do SI (BORISH; STEINKE, 2003; HISCOTT; WARE, 2011; KANY; VOLLRATH; RELJA, 2019). Diferentes populações celulares podem produzir a mesma citocina, e essas moléculas são capazes de induzir uma resposta pró ou anti-inflamatória. Os efeitos das citocinas são pleiotrópicos e dependem do alvo celular. Além disso, diferentes citocinas podem ter o mesmo efeito, ou seja, ação redundante. No entanto, também podem ter um efeito sinérgico (CHARO; RANSOHOFF, 2006; KANY; VOLLRATH; RELJA, 2019). As citocinas abordadas neste estudo foram TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-17 A, IL10, IL6, IL4 e IL-2.

Uma potente citocina pró-inflamatória é o TNF- $\alpha$ . Essa citocina é capaz de promover inflamação sistêmica e produzir efeitos deletérios em algumas doenças autoimunes (SALOMON et al., 2018). O TNF- $\alpha$  foi descrito, primeiramente, como uma proteína de ação antitumoral, mas depois se reconheceu também sua ação sobre a sobrevivência celular de monócitos, macrófagos, neutrófilos e linfócitos. Os principais produtores de TNF- $\alpha$  são macrófagos e células T, mas outras células, como células endoteliais, neutrófilos e células B já foram descritas como capazes de produzir TNF- $\alpha$  (KANY; VOLLRATH; RELJA, 2019). O IFN- $\gamma$  é uma citocina pró-inflamatória efetora da imunidade mediada por células que pode coordenar uma infinidade de funções antimicrobianas. A presença de IFN- $\gamma$  é crucial para a ativação das APCs, pois contribui para a indução da expressão de MHC II. Outras ações são o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (NOS), indução de

autofagia para a eliminação de patógenos intracelulares e aumento da secreção de citocinas pró-inflamatórias (SCHRODER et al., 2004; KAK; RAZA; TIWARI, 2018). Além disso, o IFN- $\gamma$  auxilia na regulação e manutenção da atividade das células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> (GREEN; DIFAZIO; FLYNN, 2013). Os principais produtores de IFN- $\gamma$  incluem células T, células NK, células NKT, APCs como macrófagos e DCs e células B (KAK; RAZA; TIWARI, 2018).

A IL-17 A é a citocina característica de células Th17 e o seu papel pró-inflamatório nas doenças autoimunes tem sido amplamente estudado. Outras populações de células, como células T CD8<sup>+</sup>, bem como vários subconjuntos de linfócitos inatos, incluindo células T  $\gamma\delta$  e células NKT também podem produzir IL-17 A (DANIEL; CRISTINA, 2010; MCGEACHY; CUA; GAFFEN, 2019). A IL-17 A sinaliza, predominantemente em células não hematopoiéticas, para induzir a resposta imune inata. Uma função característica da IL-17 A é a indução de quimiocinas, incluindo CXCL1, CXCL2 e CXCL8 (IL-8), as quais atraem células mieloides, como neutrófilos, para o tecido infectado ou injuriado (ONISHI; GAFFEN, 2010; MCGEACHY; CUA; GAFFEN, 2019). A IL-2 é considerada um fator de crescimento de células T essencial para a proliferação e diferenciação tanto das células T<sub>CM</sub> quanto das T<sub>EM</sub>. Além disso, estudos mostram que a IL-2 é necessária para a diferenciação das células T em T<sub>REG</sub> no timo e para sobrevivência e manutenção de funções supressoras das células T<sub>REG</sub>. Na ausência de IL-2, tais células FoxP3<sup>+</sup> desaparecem dos órgãos linfoides periféricos, presumivelmente porque a deficiência desse fator de crescimento leva à morte apoptótica das células (BARRON et al., 2010; ABBAS et al., 2018). Deve-se mencionar que a IL-2 também tem ações importantes para células NK, contribuindo com a expansão de um subconjunto de NK CD56<sup>+</sup>, as quais constituem uma população conhecidamente supressora no microambiente tumoral (GRUENBACHER et al., 2010; ABBAS et al., 2018). A IL-6 desempenha papéis importantes em doenças autoimunes e infecções bacterianas. Essa citocina é secretada por células T, monócitos, células endoteliais e fibroblastos. Assim como a IL-2, a IL-6 também atua na promoção da diferenciação de células T *naïve* a células Th (DIEHL; RINCÓN, 2002; KANY; VOLLRATH; RELJA, 2019). A primeira referência à IL-6 foi como um fator estimulador de células B, em 1986 (HIRANO et al., 1986).

A IL-10 e a IL-4 são consideradas citocinas anti-inflamatórias que contribuem para a manutenção da homeostase imunológica. No entanto, a IL-10 também pode promover respostas imunes pela sua contribuição na ativação de células B e células T CD8<sup>+</sup> (BEDKE et al., 2019). A IL-10 é secretada por muitas células do SI adaptativo, incluindo subconjuntos de células Th1, Th2 e Th17, células T<sub>REG</sub>, células T CD8<sup>+</sup> e células B. Também é produzida por



células do SI inato, incluindo as DCs, macrófagos, mastócitos, células NK, eosinófilos e neutrófilos (MOORE et al., 2001; SARAIVA; O'GARRA, 2010). A IL-4 atua em diversos subtipos celulares, como em linfócitos B e T, em células NK e em células mieloides, atua como um importante regulador da resposta imune. A IL-4 também é uma das citocinas centrais que regulam as reações inflamatórias de causa alérgica. Em células B, a IL-4 conduz a mudança de classe de Ig para IgG e IgE (JUNTTILA, 2018).

## 2.5 INDUÇÃO DE ALTERAÇÕES IMUNES POR AGROTÓXICOS

Os tecidos linfoides e as células derivadas podem ser diretamente afetados pelos agrotóxicos e seus produtos de biotransformação. A interferência direta desses compostos pode ocorrer durante o desenvolvimento, expansão e sinalização de sobrevivência celular, e podem estagnar o desenvolvimento e impedir a viabilidade das células imunes. Os principais mecanismos associados à imunotoxicidade direta são o estresse do retículo endoplasmático, a indução do estresse oxidativo, a disfunção mitocondrial, a disrupção da via ubiquitina proteossoma e a inibição de enzimas com atividade de esterase (MOKARIZADEH et al., 2015).

O estresse do retículo endoplasmático é reportado como o primeiro passo da ação citotóxica dos agrotóxicos. Essa organela é responsável pela síntese, correta conformação e transporte das proteínas e pelo estoque de cálcio. Assim, qualquer transtorno pode resultar no acúmulo de proteínas defeituosas na célula. Caso a célula não consiga depletar essas proteínas, sofrerá apoptose (MOSTAFALOU; ABDOLLAHI, 2013).

Outro efeito possível da biotransformação de agrotóxicos é o estresse oxidativo tanto pela geração excessiva de ROS como pela depleção dos estoques de enzimas antioxidantes. O estresse oxidativo pode levar à morte celular por danos a componentes celulares como lipídios, proteínas e DNA. Os danos ao DNA são particularmente deletérios, pois podem causar mutações carcinogênicas (SHADNIA; ABDOLLAHI; AZIZI, 2006). A grande maioria dos agrotóxicos, especialmente os agentes neurotóxicos, tem demonstrado exercer a sua toxicidade por interferir na fosforilação oxidativa da cadeia respiratória mitocondrial. Essa interferência pode prejudicar as funções celulares ou levar à morte pela diminuição do consumo de oxigênio e do abastecimento de energia (ABDOLLAHI et al., 2004).

A disfunção da via ubiquitina proteossoma, responsável pela autofagia, é outro mecanismo pelo qual os agrotóxicos promovem a sua citotoxicidade. A consequência é o acúmulo citoplasmático de proteínas e, assim, o aumento da sensibilidade à apoptose (CHOU et al., 2010; MOSTAFALOU; ABDOLLAHI, 2013).

O efeito mais notável dos agrotóxicos OF e CBM é a inibição de enzimas com atividade de esterase: acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE). As exposições crônicas e agudas aos agrotóxicos são avaliadas pela atividade desses biomarcadores. Sendo assim, já que muitos compostos colinérgicos (incluindo acetilcolina, colina acetiltransferase, transportador de colina de alta afinidade, receptores muscarínicos e nicotínicos) são expressos em células imunes (especialmente em linfócitos), OF e CBM podem alterar a sinalização colinérgica linfocitária pela inibição da AChE. Na intoxicação por OF, a hiperestimulação dos receptores colinérgicos pela acetilcolina acumulada pode levar a uma rápida e transitória sinalização de cálcio, causando prejuízos à modulação das vias de transdução de sinal em células B e T, assim como na resposta dos macrófagos a estímulos inflamatórios. Em contraste, como *feedback* negativo, a regulação negativa dos receptores colinérgicos pela exposição crônica aos OF pode acentuar a via anti-inflamatória colinérgica e suprimir a atividade das células T. Assim, a predisposição a infecções são consequências funcionais da intoxicação crônica por OF (TARKOWSKI; LUTZ; BIRINDELLI, 2004; BANKS; LEIN, 2012). Além disso, a inibição das esterases também pode prejudicar a primeira linha do SI contra infecções, pois essas enzimas têm um papel crucial na ativação do sistema complemento (GALLOWAY; HANDY, 2003; CHAMBERS; OPPENHEIMER, 2004).

As desordens imunológicas resultantes da exposição aos agrotóxicos dependem do tipo de célula afetada. Por exemplo, infecções recorrentes têm sido observadas em pacientes expostos com distúrbios da função neutrofílica (WANG, C. Y. et al., 2010). Essas substâncias também podem afetar a atividade citolítica das células NK, o que leva ao aumento do risco de câncer e infecções (LUEBKE, 2002; MOKARIZADEH et al., 2015). Outros efeitos importantes no SI, como o prejuízo funcional das DCs e dos macrófagos, também são relatados. Devido às importantes atividades dessas células (como fagocitose e apresentação de antígenos) tamanha disfunção pode levar à resposta inflamatória crônica e inapropriada. Consequentemente, o risco de desenvolver alergias e câncer está aumentado. Regulação negativa das moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86 e da expressão de MHC, o prejuízo do *burst* respiratório e a modulação fenotípica são os possíveis mecanismos pelos quais os agrotóxicos prejudicam a função normal das APCs (USTYUGOVA et al., 2007; SCHÄFER

et al., 2013). Significante diminuição de HLA-DR nas células mononucleares do SP de pacientes com intoxicação aguda por OF é bem documentada, assim como disfunção imunológica dela consequente (XIA et al., 2014).

## 2.6 A CITOMETRIA DE FLUXO NA AVALIAÇÃO DO SISTEMA IMUNE

Devido à complexidade do SI, faz-se necessária a avaliação de vários parâmetros de forma simultânea e a caracterização de muitos subconjuntos de células. Nesse sentido, a citometria de fluxo tornou-se uma ferramenta muito valiosa para o diagnóstico imunológico (STREITZ et al., 2013; KANEGANE et al., 2018). As aplicações da citometria de fluxo na avaliação do perfil imune e das imunodeficiências são múltiplas e incluem a investigação de populações e subpopulações celulares específicas, proteínas específicas de membrana celular, proteínas intracelulares e intranucleares, efeitos biológicos associados a defeitos imunológicos e anormalidades imunológicas funcionais (KANEGANE et al., 2018; VAN DONGEN et al., 2019).

Além disso, como é um método já consolidado no diagnóstico das neoplasias hematológicas (CRAIG; FOON, 2008), o monitoramento imunológico por citometria de fluxo tem sido crucial no estudo dos efeitos de novas terapêuticas destinadas a modular a resposta imune, como, por exemplo, na redução da rejeição aos transplantes de órgãos e no acompanhamento das doenças autoimunes (STREITZ et al., 2013).

O uso de citometria de fluxo em estudos de toxicologia envolve principalmente a fenotipagem imunológica de suspensões celulares a partir de como sangue periférico, baço, linfonodo, medula óssea, dentre outras estruturas. As informações obtidas complementam os outros elementos da toxicologia como as dosagens bioquímicas. Essa ferramenta pode fornecer informações relacionadas aos efeitos diretos e indiretos de diferentes agentes (incluindo os agrotóxicos) pela presença, fenótipo e função das células linfoides e seus subtipos (isto é, células B, células T, subconjuntos de células T, células NK) que não podem ser determinados utilizando a abordagem fenotípica padrão (POCKLEY et al., 2015).

A citometria de fluxo também é útil para a dosagem de citocinas séricas ou plasmáticas. São ensaios do tipo “multiplex” que tem como objetivo medir várias citocinas na mesma amostra ao mesmo tempo. Em comparação com o *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA) tradicional, os ensaios multiplex têm várias vantagens, como menor volume

de amostra necessário; eficiência em termos de tempo e capacidade de detectar com segurança diferentes proteínas em uma ampla faixa dinâmica de concentrações (LENG et al., 2008).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar o perfil imune celular e de citocinas plasmáticas em agricultores com exposição ocupacional a múltiplos agrotóxicos residentes em Santo Amaro da Imperatriz (SC).

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar valores relativos e absolutos de neutrófilos (totais, maduros e imaturos), monócitos (totais, clássicos, intermediários e não clássicos), eosinófilos, basófilos, linfócitos B e seus diferentes estágios maturativos, linfócitos T e suas subpopulações, células NK, células NKT e DCs (totais, mDCs e pDCs) em amostras de SP;
- Determinar a concentração das citocinas plasmáticas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IFN- $\gamma$  e TNF;
- Comparar os resultados com um grupo controle;
- Correlacionar a quantidade de células imunes dos agricultores com os resultados de seus respectivos exames, conforme seguem: colinesterases AChE e BChE, eritrograma, glicemia de jejum, hemoglobina glicosilada (HbA1c), alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), gama glutamiltransferase (GGT), creatinina, ureia, proteína C reativa (PCR), hormônio tireoestimulante (TSH) e testosterona livre (TTEL).

## 4 MATERIAIS E METODOLOGIA

### 4.1 DELINEAMENTO E AMOSTRAGEM

Neste estudo observacional transversal foram avaliados 40 agricultores com exposição ocupacional a múltiplos agrotóxicos (grupo exposto) e 30 indivíduos sem histórico de exposição (grupo controle), os quais foram pareados quanto à faixa etária e gênero. O cálculo amostral foi realizado pela Equação 1, a seguir (MIOT, 2011):

$$n = N \cdot Z^2 \cdot p \cdot q / Z^2 \cdot p \cdot q + E^2 \cdot N - 1 \quad (1)$$

A amostra (n) estimada foi de 45 indivíduos considerando os seguintes parâmetros: tamanho da população (N) de 1337 agricultores (conforme dados fornecidos pela Secretaria de Agricultura e Desenvolvimento Rural de Santo Amaro da Imperatriz), margem de erro (E) de 12% e grau de confiança (Z) igual a 90%.

### 4.2 ÉTICA E SUJEITOS DA PESQUISA

Este estudo faz parte de um projeto multidisciplinar denominado “Estudo de População Exposta Ocupacionalmente a Agrotóxicos” que está sendo desenvolvido no Hospital Universitário Prof. Polydoro Ernani de São Thiago da Universidade Federal de Santa Catarina (HU-UFSC). Estão envolvidas no projeto diversas especialidades médicas, além da Unidade de Laboratório de Análises Clínicas (ULAC), visando uma avaliação completa das condições clínicas dos agricultores que possivelmente estejam associadas à exposição a agrotóxicos. O Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH) da UFSC aprovou este estudo sob o número de parecer 507.310 (ANEXO I).

Foram elegíveis para a pesquisa 43 agricultores com histórico de exposição ocupacional a múltiplos agrotóxicos por, no mínimo, 15 anos. A seleção de agricultores nessas condições contou com o apoio da Secretaria de Saúde do município de Santo Amaro da Imperatriz (SC). Foram realizadas visitas às casas e/ou aos locais de trabalho dos agricultores elencados e, nessa ocasião, foram oferecidos esclarecimentos a respeito do projeto, assim como o convite de participação. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi aplicado nos casos de aceite (APÊNDICE A). Em seguida, os participantes responderam a

um questionário (APÊNDICE B) contendo perguntas a respeito da história ocupacional, exposição a agentes químicos, procedência dos alimentos e água consumidos e dados sociodemográficos. Em seguida, foram agendadas as consultas médicas e fonoaudiológicas para pequenos grupos no HU-UFSC, que ocorreram entre fevereiro e junho de 2018. No dia do agendamento, os agricultores primeiramente compareceram em jejum à ULAC, onde se procedeu a coleta de SP. Nos respectivos setores do laboratório foram realizados exames hematológicos, bioquímicos, hormonais e a avaliação de colinesterases. Durante a avaliação médica subsequente, foi aplicado um segundo questionário a respeito do histórico clínico (questões a respeito de doenças como câncer, diabetes, hipotireoidismo, problemas de audição, depressão e ansiedade, além do uso de medicamentos), que está disponível no APÊNDICE C. Indivíduos com doenças autoimunes ou alérgicas conhecidas foram excluídos da pesquisa, no total de três indivíduos: um portador de artrite reumatoide e dois acometidos por asma. Portanto, foi avaliado um total de 40 agricultores.

Para o grupo controle, foram selecionados voluntários que estivessem realizando exames de rotina no setor de coleta da ULAC do HU-UFSC, entre julho e outubro de 2018. Após um breve esclarecimento a respeito dos projetos (as amostras também foram utilizadas por outra pesquisa desenvolvida no LOEH) e a confirmação verbal de que os indivíduos nunca haviam trabalhado na agricultura, o TCLE foi aplicado aos que aceitaram participar da pesquisa. Esses participantes também responderam a um breve questionário (APÊNDICE D) e, em seguida, procedeu-se à coleta de SP. Nenhum participante do grupo controle foi excluído da pesquisa.

#### **4.3 METODOLOGIA, EQUIPAMENTOS E REAGENTES**

Para a avaliação das células imunes foi utilizado o método de plataforma dupla, utilizando o citômetro de fluxo FACSCanto II (BD Biosciences, EUA) com o *software* FACS Diva (BD Biosciences, EUA) para contagens de valores relativos das células imunes e o analisador de células hematológicas Sysmex XE-2100D (Sysmex Corporation, Japão) para contagens de valores absolutos. Os valores relativos obtidos pela citometria de fluxo foram multiplicados pelas contagens absolutas obtidas pelo contador hematológico, e, assim

determinou-se o valor absoluto de cada subpopulação celular. Ambos os equipamentos têm sua eficiência avaliada diariamente por controles de qualidade internos.

#### 4.3.1 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

De cada participante, foram coletados 4 ml de SP em tubos contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA/K3) (Vacuette, Greiner Bio-One, Alemanha). Para a avaliação por citometria de fluxo, tubos de poliestireno de 5 ml (12 mm x 75 mm) (BD Biosciences, EUA) foram numerados de 1 a 6 e mais um tubo denominado C (controle). O painel de anticorpos monoclonais utilizados neste estudo, além dos procedimentos de marcação, aquisição e análise das amostras foram realizados conforme Cardoso e Santos-Silva (2019) (CARDOSO; SANTOS-SILVA, 2019). Assim, para a preparação do Tubo 1, em um tubo Falcon de 10 ml foram adicionados 300 µl de SP e, em seguida, solução tampão fosfato salina (PBS) até completar o volume. O tubo foi centrifugado por 5 minutos a 540 x g e o sobrenadante foi descartado. Esse procedimento foi repetido mais duas vezes e o precipitado final foi suspenso em 100 µl de PBS e transferido para o tubo de poliestireno número 1. Para o preparo dos Tubos 2, 3 e 4, o volume de SP foi determinado de acordo com a contagem absoluta de linfócitos da amostra (avaliada pelo Sysmex XE-2100D), conforme a Tabela 1.

**Tabela 1.** Volume de sangue periférico adicionado aos Tubos 2, 3 e 4.

<b>Linfócitos/ mm<sup>3</sup></b>	<b>Volume de SP (em µl)</b>
< 1.000	300
1.000 a 1.500	280
1.500 a 2.500	250
> 2.500	200

SP: sangue periférico.

Para o preparo do Tubo 6, o volume de SP foi determinado considerando a contagem de leucócitos da amostra (avaliada pelo Sysmex XE-2100D), conforme a Tabela 2.



**Tabela 2.** Volume de sangue periférico adicionado ao tubo 6.

Leucócitos/ mm <sup>3</sup>	Volume de SP (em µl)
< 4.000	300
4.000 a 5.000	280
5.001 a 7.000	250
> 7.000	200

SP: sangue periférico.

Depois de estabelecidos os volumes das amostras, as mesmas foram adicionadas aos respectivos tubos. Os Tubos 1, 2, 3 e 6 foram marcados com os anticorpos monoclonais correspondentes conforme a Tabela 3, que ilustra o painel utilizado.

**Tabela 3.** Painel de anticorpos monoclonais.

Tubo	PacB	PacO	FITC	PE	PerCP Cy5-5	PECy7	APC	APCH7
1	CD20/ CD4*	CD45	CD8/ Lambda	CD56/ Kappa	CD5	CD19/ TCR γδ	CD3	CD38
2	—	CD45	CD62L	CD197 (CCR7)	CD4	CD45 RA	CD3	CD8
3	HLA-DR	CD45	CD57	CD28	CD4	CD45 RA	CD3	CD8
4	CD3	CD45	CD127	CD25	CD4	CD45 RA	FoxP3*	CD8
5	CD20	CD45	IgD	CD24	CD27	CD19	IgM	CD38
6	HLA-DR	CD45	CD16	CD123	CD11c	CD10	CD14	CD3/CD19/ CD20
C	—	—	—	—	—	—	—	—

Tubo 1: análise do perfil leucocitário; Tubos 2 e 3: análise das células T; Tubo 4: análise das células T reguladoras; Tubo 5: análise das células B e Tubo 6: análise das células dendríticas, monócitos e neutrófilos. APC: alofocianina; APCH7: alofocianina H7; FITC: isotiocianato de fluoresceína; PacB: *Pacific Blue/V450*; PacO: *Pacific Orange/V500*; PE: ficoeritrina; PECy7: ficoeritrina Cy7; PerCP Cy5-5: proteína clorofila peridina; \*CD4 foi conjugado com *Brilliant violet 421 (BV421)* e FoxP3 foi conjugado com *Alexa Fluor 647 (AF647)*. C: tubo controle. Fonte: (CARDOSO; SANTOS-SILVA, 2019).

Os volumes de cada anticorpo monoclonal assim como as informações técnicas dos mesmos estão disponíveis na Tabela 4.

**Tabela 4.** Informações técnicas dos anticorpos monoclonais utilizados no painel.

<b>Marcador</b>	<b>Fluorocromo</b>	<b>Volume/teste (µl)</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Clone</b>
<b>CD3</b>	APC	5	BD Bioscience	UCHT1
<b>CD3</b>	APCH7	5	BD Bioscience	SK7
<b>CD3</b>	PacB	1	Exbio	UCHT1
<b>CD4</b>	PerCP Cy5-5	1	Exbio	MEM-241
<b>CD4</b>	BV421	2	BD Bioscience	RP4-T4
<b>CD5</b>	PerCP Cy5-5	5	BD Bioscience	L17F12
<b>CD8</b>	FITC	3	Beckman Coulter	B9.11
<b>CD8</b>	APCH7	2	BD Bioscience	SK1
<b>CD10</b>	PECy7	3	BD Bioscience	HI10A
<b>CD11c</b>	PerCP Cy5-5	1	Exbio	BU15
<b>CD14</b>	APC	2	BD Bioscience	MφP9
<b>CD16</b>	FITC	7	Beckman Coulter	3G8
<b>CD19</b>	PECy7	2	Beckman Coulter	J3-119
<b>CD19</b>	APCH7	1	Biolegend	HIB19
<b>CD20</b>	APCH7	1	BD Bioscience	2H7
<b>CD20</b>	PacB	2	BD Bioscience	L27
<b>CD24</b>	PE	10	BD Bioscience	ML5
<b>CD25</b>	PE	10	BD Bioscience	M-A251
<b>CD27</b>	PerCP Cy5-5	2	BD Bioscience	M-T271
<b>CD28</b>	PE	7	BD Bioscience	CD28.2
<b>CD38</b>	APCH7	2	BD Bioscience	HB7
<b>CD45</b>	PacO	1	BD Bioscience	HI30
<b>CD45RA</b>	PECy7	3	BD Bioscience	HI100
<b>CD56</b>	PE	10	Beckman Coulter	N901 (NKH1)
<b>CD57</b>	FITC	15	BD Bioscience	HNK-1
<b>CD62L</b>	FITC	15	Exbio	LT-TD180
<b>CD123</b>	PE	3	BD Bioscience	7G3
<b>CD127</b>	FITC	5	BD Bioscience	HIL-7R-M21
<b>CD197 (CCR7)</b>	PE	15	Biolegend	G043H7
<b>FoxP3</b>	AF647	7	BD Bioscience	236A/E7
<b>HLA-DR</b>	PacB	2	BD Bioscience	L243
<b>IgD</b>	FITC	5	Beckman Coulter	IADB6

**Tabela 5.** Informações técnicas dos anticorpos monoclonais utilizados no painel.

(continuação)

Marcador	Fluorocromo	Volume/teste (µl)	Fabricante	Clone
Igκ	PE	15	BD Bioscience	G20-193
Igλ	FITC	7	BD Bioscience	JDC-12
IgM	APC	10	BD Bioscience	G20-127

AF647: *Alexa fluor 647*; APC: alofocianina; APCH7: alofocianina H7; BV421: *Brilliant violet 421*; FITC: isotiocianato de fluoresceína; PacB: *Pacific Blue/V450*; PacO: *Pacific Orange/V500*; PE: ficoeritrina; PECy7: ficoeritrina Cy7; PerCP Cy5-5: proteína clorofila peridinina; Ig: imunoglobulina. Fonte: (CARDOSO; SANTOS-SILVA, 2019).

Após homogeneização em vórtex, foram incubados em ausência de luz à temperatura ambiente por 30 minutos. Depois foram adicionados 2 ml de solução lisante de hemácias (BD FACS; *Lysing Solution*) e as amostras foram novamente homogeneizadas e incubadas por 15 minutos. Posteriormente, os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 300 x g, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi suspenso em 500 µL de PBS. A suspensão celular obtida foi adquirida no citômetro de fluxo FACSCanto II (BD Biosciences, EUA). Um tubo controle foi preparado com 30 µl de SP, sem adição de anticorpos monoclonais, seguindo os mesmos procedimentos, foram salvos 10.000 eventos durante a aquisição. Já na aquisição do Tubo 1, foram salvos 200.000 eventos. Na aquisição dos Tubos 2 e 3 foram salvos 100.000 eventos e utilizou-se uma estratégia de seleção sequencial de eventos de acordo com marcadores específicos (do inglês *gate*) em CD3<sup>+</sup>.

O preparo do Tubo 4 inicia com a adição do volume predeterminado de SP e dos anticorpos monoclonais conforme a Tabela 1, com exceção do FoxP3 (por este ser um anticorpo anti-fator de transcrição FoxP3, sua marcação precisou ser intracelular, fazendo-se necessário um preparo prévio da membrana celular). Após a homogeneização em vórtex, a amostra com os anticorpos foi incubada a 2–8 °C, na ausência de luz, por 30 minutos. Em seguida, foi adicionado 1 ml de PBS refrigerado e o tubo foi centrifugado por 5 minutos a 540 x g. O sobrenadante foi retirado e o *pellet* foi suspenso por vórtex. 1 ml de solução tampão *Fix/Perm Buffer* (BD Pharmingen™ *Transcription Factor Buffer Set*) refrigerado foi adicionado, seguido por homogeneização e nova incubação a 2–8 °C, na ausência de luz, por 40 minutos. Ao término, foi adicionado 1 ml de solução tampão *Perm/Wash Buffer* (BD Pharmingen™ *Transcription Factor Buffer Set*). Após esse procedimento, foi realizada a

centrifugação do tubo (a partir desse momento, as centrifugações ocorreram em centrífuga refrigerada por 6 minutos a 350 x g). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensão em 2 ml de *Perm/Wash Buffer*. Repetiu-se a centrifugação sob as mesmas condições, e, dessa forma, o *pellet* foi ressuspensão em 100 µl de *Perm/Wash Buffer*, seguido da adição do anticorpo monoclonal FoxP3 e homogeneização. A amostra foi submetida à incubação a 2–8 °C, na ausência de luz, por 40 minutos. 2 ml de *Perm/Wash Buffer* foi acrescentado e o tubo foi centrifugado seguido do descarte do sobrenadante. Essa etapa de lavagem foi realizada mais uma vez e, ao final, o *pellet* foi suspenso em 300 µl de PBS. Assim, a amostra estava pronta para a aquisição no citômetro de fluxo FACSCanto II (BD Biosciences, EUA). Para a análise do Tubo 4, foi realizado *gate* em CD3<sup>+</sup> e foram salvos 100.000 eventos.

Para a preparação do Tubo 5, as células mononucleares foram separadas por densidade, utilizando o reagente Histopaque®-1077 (Sigma–Aldrich, USA). Assim, em um tubo de poliestireno contendo 2 ml de Histopaque foi adicionada uma mistura de 1 ml de SP e 1 ml de PBS. Em seguida, o tubo foi centrifugado por 30 minutos a 540 x g. O anel de células formado foi coletado com pipeta *Pasteur* e colocado em outro tubo, onde foi acrescentado 4 ml de PBS. Após nova centrifugação por 5 minutos a 300 x g, o sobrenadante foi descartado e o precipitado de células mononucleares foi suspenso em 100 µl de PBS, e em seguida transferido para o Tubo 5. A partir desse procedimento o protocolo de marcação seguiu os mesmos passos descritos para os Tubos 1, 2, 3 e 6. Para a análise do Tubo 5, utilizou a estratégia de *gate* em CD19<sup>+</sup> e foram salvos 50.000 eventos.

#### 4.4 ANÁLISE DAS CÉLULAS IMUNES

A análise das células imunes foi realizada utilizando o *software* Infinicyt versão 1.6.0 (Cytognos S.L., Salamanca, Espanha).

As células avaliadas foram identificadas de acordo com os seus fenótipos, como segue: leucócitos totais (CD45<sup>+</sup>), neutrófilos (HLA-DR<sup>-</sup>, CD14<sup>-</sup>), monócitos (CD14<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>), basófilos (CD123<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>-</sup>), eosinófilos (CD45<sup>+</sup> e SSC alto). Os linfócitos foram subdivididos em T CD4<sup>+</sup> (CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup>), T CD8<sup>+</sup> (CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> CD4<sup>-</sup>), NKT (CD3<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup>), T γδ (CD3<sup>+</sup> CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup>), células B (CD19<sup>+</sup>) e NK (CD3<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup>).

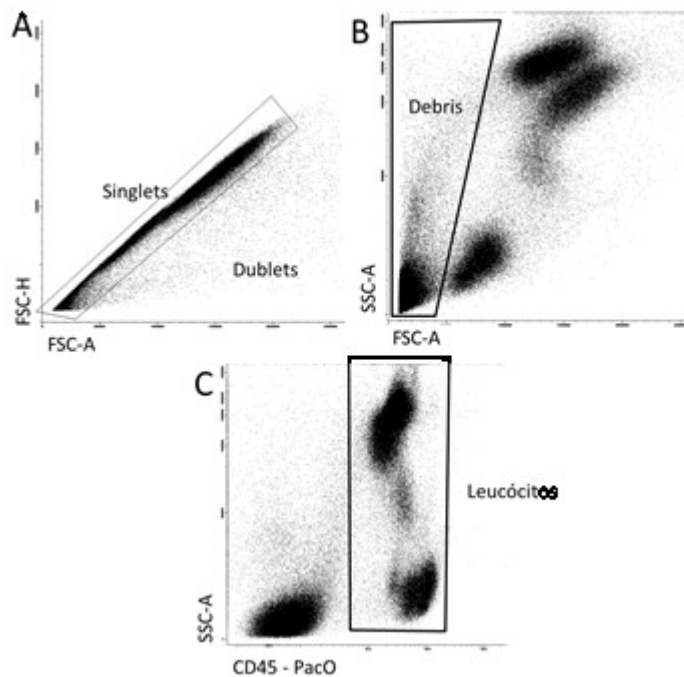
Os linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> foram subclassificados como *naïve* (CD62L<sup>+</sup> CD45 RA<sup>+</sup>), *central memory* (CD62L<sup>+</sup> CD45 RA<sup>-</sup>), *effector memory* (CD62L<sup>-</sup> CD45 RA<sup>-</sup>) e *effector memory* RA (CD62L<sup>-</sup> CD45 RA<sup>+</sup>). Os marcadores de ativação como CD57, HLA-DR, CD45

RA e CD28 também foram avaliados para as células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>, além da expressão de CD25 por T CD8. As células T<sub>REG</sub> (CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup>) foram classificadas em *naïve* (CD45 RA<sup>+</sup>) e de memória (CD45 RA<sup>-</sup>).

As células B foram subdivididas em células B maduras (CD19<sup>+</sup> CD20<sup>+</sup>) e plasmablastos (CD19<sup>+</sup> CD20<sup>-</sup> CD38<sup>hi</sup>). As células B maduras também foram classificadas de acordo com a expressão das IgD e IgM. De acordo com a expressão de CD27, as células B também foram identificadas como *naïve* (CD27<sup>-</sup>) e de memória (CD27<sup>+</sup>). As células B de transição (IgM<sup>+</sup> CD27<sup>-</sup> CD24<sup>hi</sup> CD38<sup>hi</sup>) e as células B reguladoras (B<sub>REG</sub>) (CD19<sup>+</sup> CD24<sup>hi</sup> CD38<sup>hi</sup>) também foram enumeradas.

Em todos os tubos, a análise iniciou com a remoção de células que passam ligadas a outras (*dublets*) e restos celulares (*debris*) celulares, seguida pela remoção da população eritroide (CD45<sup>-</sup>) e a seleção da população leucocitária (CD45<sup>+</sup>), conforme a Figura 6.

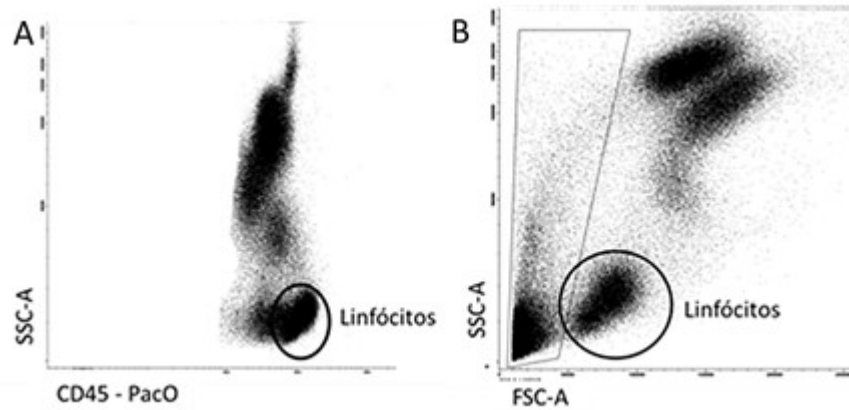
**Figura 6.** Dot plots mostrando os *singlets*, *dublets* e *debris* celulares e a seleção da população leucocitária.



Painel A) remoção dos *dublets* celulares utilizando *forward scatter-área* (FSC-A) x *forward scatter-height* (FSC-H); Painel B) remoção dos *debris* celulares utilizando *forward scatter-área* (FSC-A) x *side scatter-area* (SSC-A); Painel C) seleção da população de leucócitos (CD45<sup>+</sup>) utilizando CD45/ PacO x *side scatter-area* (SSC-A). PacO: *Pacific Orange/V500*. Fonte: autora.

A seleção da população linfocitária total foi inicialmente definida pelos *gates* mostrados na Figura 7. Esta estratégia foi utilizada na análise dos Tubos de 1 a 5.

**Figura 7.** *Dot plots* mostrando *gates* utilizados para determinar a população linfocitária total.

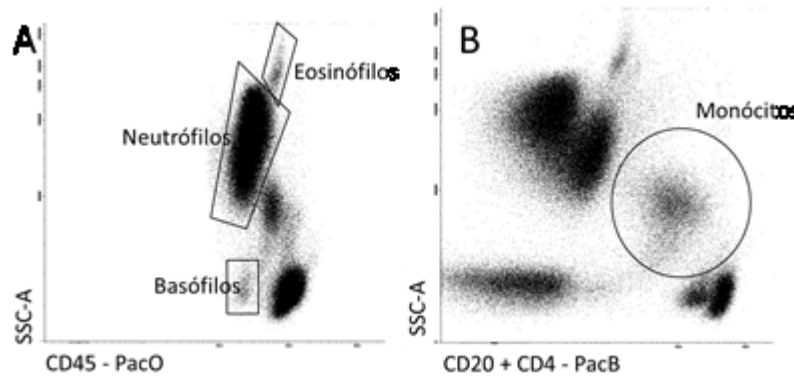


Painel A) seleção dos linfócitos totais utilizando o marcador CD45/ PacO x *side scatter-area* (SSC-A). Painel B) seleção dos linfócitos utilizando *side scatter-area* (SSC-A) x *forward scatter-area* (FSC-A).  
PacO: *Pacific Orange/V500*. Fonte: autora.

#### 4.4.1 ANÁLISE DO TUBO 1

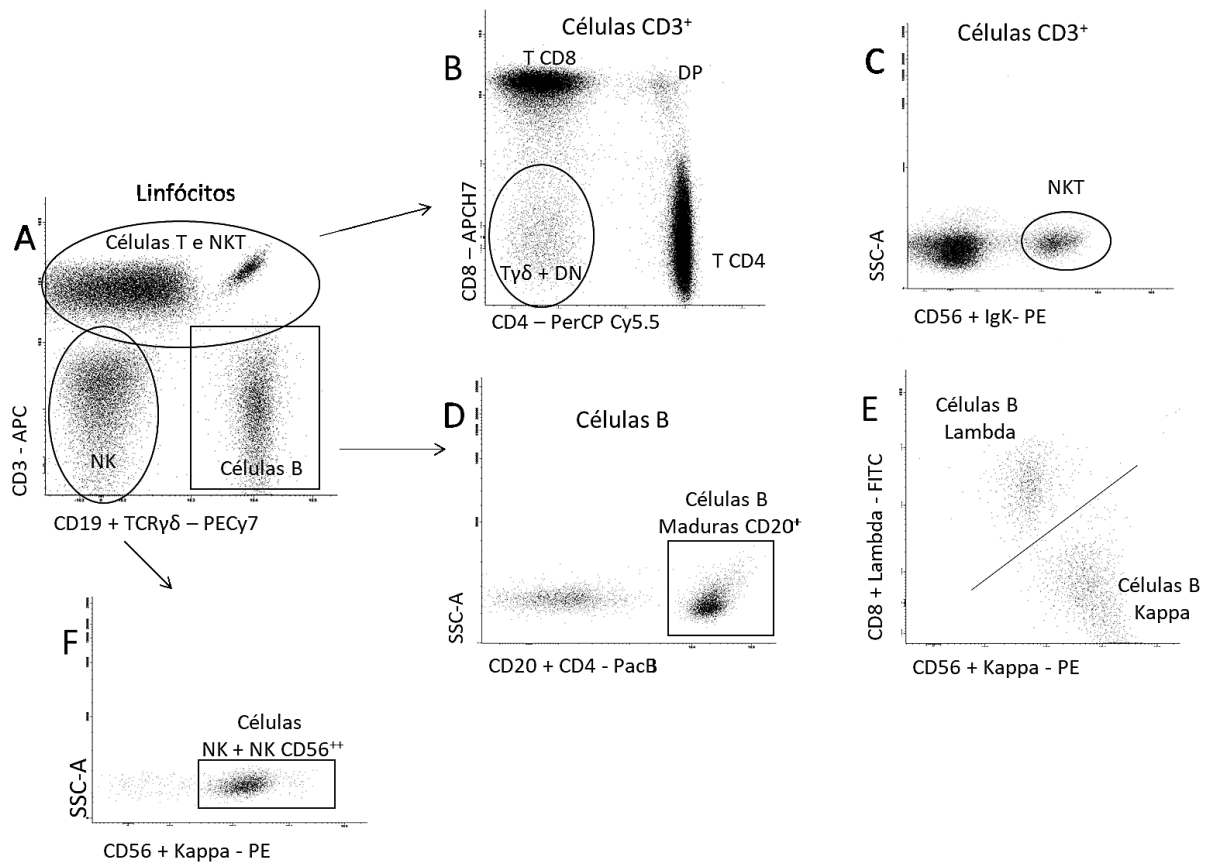
O objetivo do Tubo 1 foi determinar a celularidade (perfil leucocitário) e a clonalidade das células B. Os valores relativos de neutrófilos, basófilos, monócitos, eosinófilos e subtipos de linfócitos foram determinados utilizando as estratégias de *gate* mostradas nas Figuras 8 e 9.

**Figura 8.** Estratégias de *gate* para a seleção dos neutrófilos, basófilos, monócitos e eosinófilos.



Painel A) neutrófilos, basófilos e eosinófilos selecionados de acordo com a posição no *dot plot*. Painel B) monócitos selecionados de acordo com a fraca expressão de CD4. SSC-A: *side scatter-area*; PacO: *Pacific Orange/V500* e PacB: *Pacific Blue/V450*. Fonte: autora.

**Figura 9.** Estratégias de *gate* para a seleção dos subtipos de linfócitos.

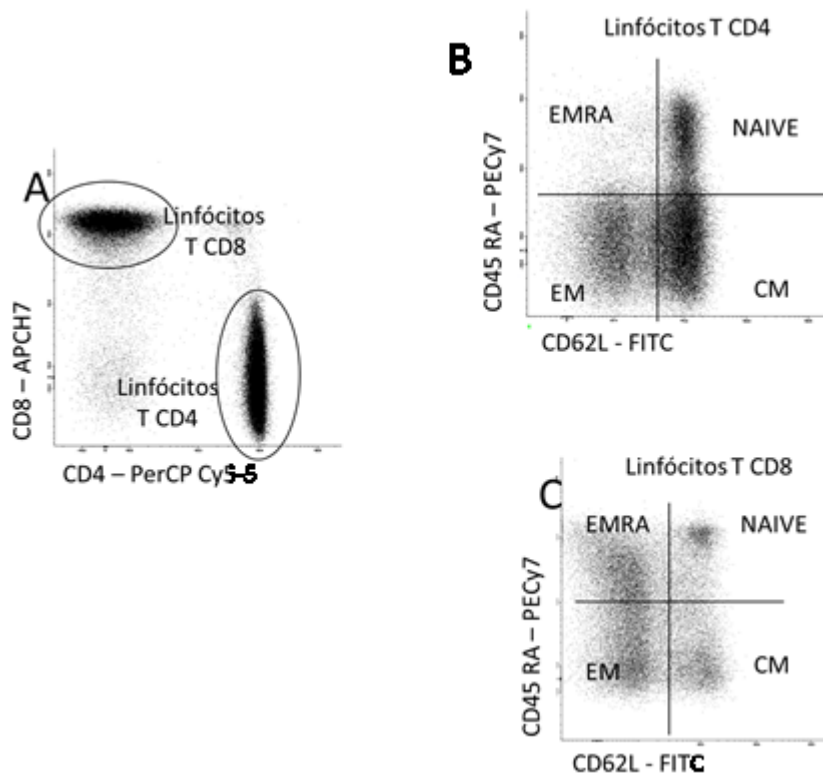


Painel A) linfócitos totais separados em linfócitos T e NKT (ambos CD3<sup>+</sup>), linfócitos B (CD19<sup>+</sup>) e células NK (duplamente negativas). Painel B) linfócitos CD3<sup>+</sup> subdivididos em T CD8<sup>+</sup>, T CD4<sup>+</sup>, T duplamente positivos e T duplamente negativos. Painel C) células NKT no CD56<sup>+</sup>. Painel D) seleção das células B maduras (CD20<sup>+</sup>). Painel E) avaliação da clonalidade das células B maduras (a relação Kappa/Lambda entre 0,5 e 3,0 é considerada normal). Painel F) células NK subdivididas em CD56<sup>+</sup> e CD56<sup>hi</sup>. APC: alofocianina; APCH7: alofocianina H7; FITC: isotiocianato de fluoresceína; PacB: *Pacific Blue/V450*; PacO: *Pacific Orange/V500*; PE: ficoeritrina; PECy7: ficoeritrina Cy7; PerCP Cy5-5: proteína clorofila peridina e Ig: imunoglobulina. Fonte: autora.

#### 4.4.2 ANÁLISE DO TUBO 2

O Tubo 2 foi utilizado para classificar as células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> nos subtipos *naïve*, T<sub>CM</sub>, T<sub>EM</sub> e T<sub>EM RA</sub>. Para isso, as expressões de CD62L e de CD45 RA foram consideradas e as análises foram realizadas conforme a Figura 10.

**Figura 10.** Estratégias de *gate* para a seleção dos subtipos de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>.



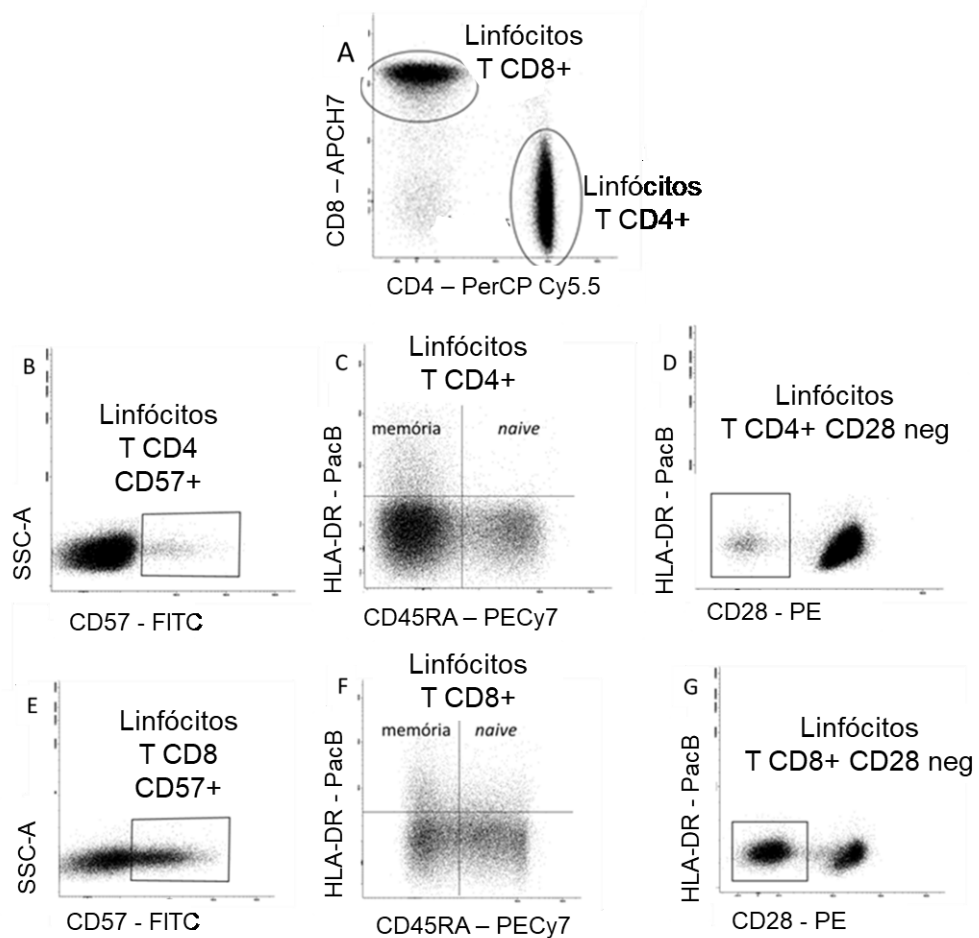
Painel A) separação dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>. Painel B) seleção das subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup>: *naïve* (CD62L<sup>+</sup> CD45 RA<sup>+</sup>); CM (CD62L<sup>+</sup> CD45 RA<sup>-</sup>); EM (CD62L<sup>-</sup> CD45 RA<sup>-</sup>) e EM RA (CD62L<sup>-</sup> CD45 RA<sup>+</sup>). Painel C) seleção das subpopulações de linfócitos T CD8<sup>+</sup>: *naïve* (CD62L<sup>+</sup> CD45 RA<sup>+</sup>); CM (CD62L<sup>+</sup> CD45 RA<sup>-</sup>); EM (CD62L<sup>-</sup> CD45 RA<sup>-</sup>) e EM RA (CD62L<sup>-</sup> CD45 RA<sup>+</sup>). APCH7: alofocianina H7; FITC: fluorescein isothiocyanate; PECy7: ficoeritrina Cy7 e PerCP Cy5-5: proteína clorofila peridina. Fonte: autora.



#### 4.4.3 ANÁLISE DO TUBO 3

As células T foram também avaliadas no Tubo 3. Nesse caso, foram considerados os marcadores de ativação CD57, CD28 e HLA-DR. Os *dot plots* estão demonstrados na Figura 11.

**Figura 11.** Estratégias de *gate* para a análise da ativação das células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>.

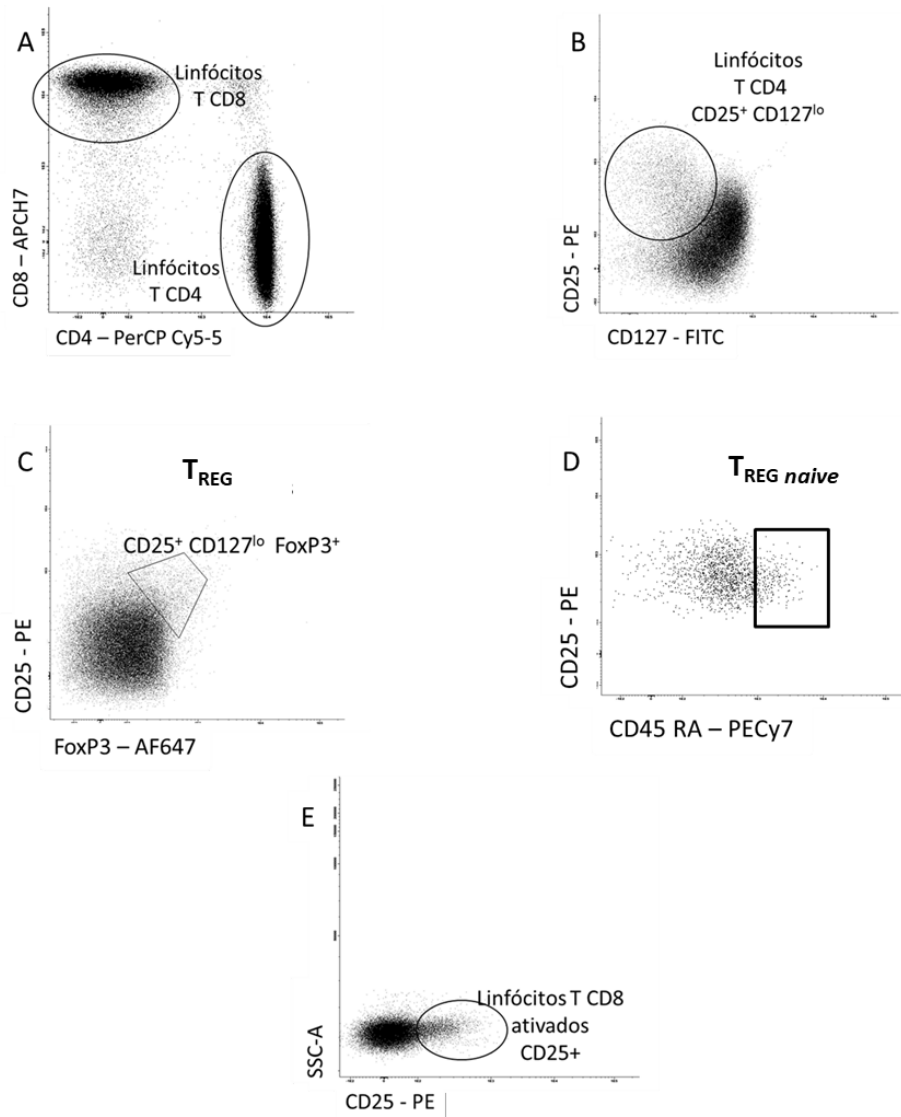


Painel A) separação dos linfócitos T CD4 e T CD8. Painel B) análise da expressão de CD57 na população de linfócitos T CD4. Painel C) avaliação do marcador HLA-DR nas populações *memory* e *naïve* de linfócitos T CD4<sup>+</sup>. Painel D) expressão de CD28 pelos linfócitos T CD4<sup>+</sup>. Painel E) análise da expressão de CD57 na população de linfócitos T CD8. Painel F) avaliação do marcador HLA-DR nas populações *memory* e *naïve* de linfócitos T CD8. Painel G) expressão de CD28 pelos linfócitos T CD8. SSC-A: *side scatter-area*; neg: expressão negativa; APCH7: alofocianina H7; FITC: fluorescein isothiocyanate; PacB: *Pacific Blue/V450*; PE: ficoeritrina; PECy7: ficoeritrina Cy7; PerCP Cy5-5: proteína clorofila peridina. Fonte: autora.

#### 4.4.4 ANÁLISE DO TUBO 4

O objetivo do Tubo 4 foi avaliar as células  $T_{REG}$  utilizando a combinação dos marcadores de superfície CD4, CD25, CD127 e o marcador intracelular FoxP3. A Figura 12 mostra os *dot plots*.

**Figura 12.** Estratégias de *gate* para a análise das células  $T_{REG}$ .

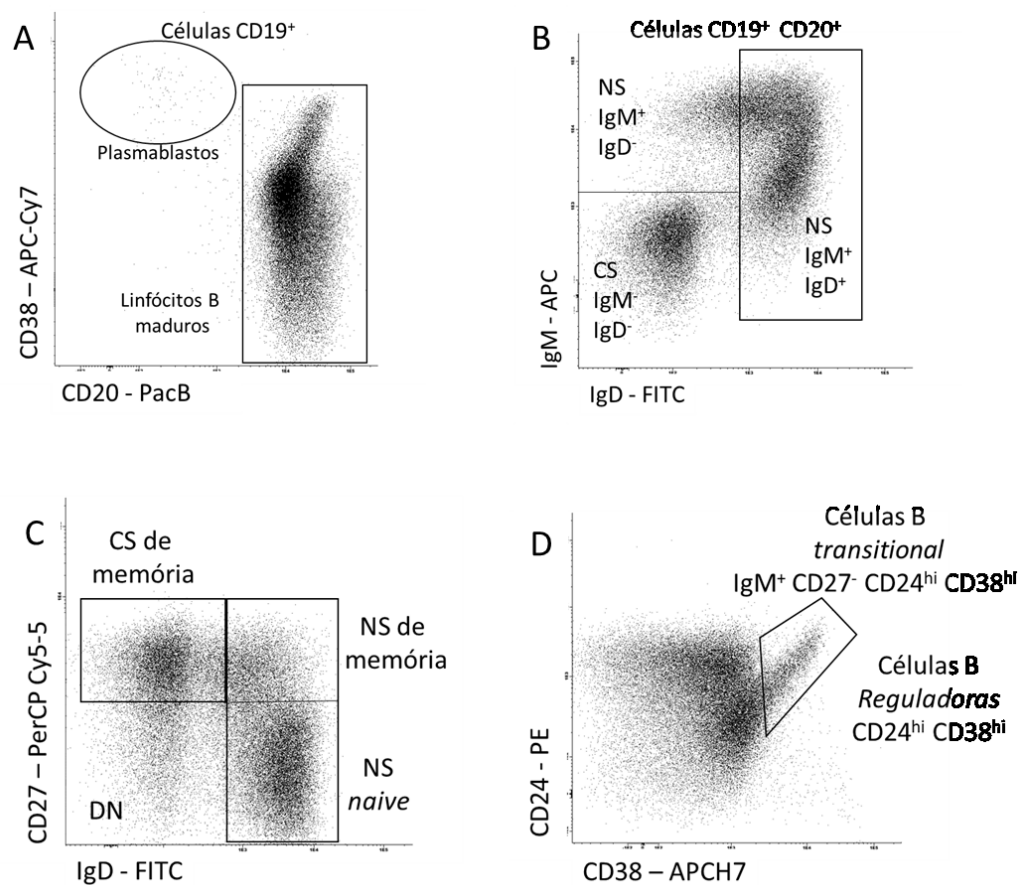


Painel A) separação dos linfócitos  $T CD4^+$  e  $T CD8^+$ . Painel B) primeiro *gate* de seleção das células  $T_{REG}$  utilizando CD25 e CD127. Painel C) segundo *gate* de seleção das células  $T_{REG}$  utilizando o marcador intracelular FoxP3. Painel D) as células  $T_{REG}$  foram classificadas de acordo com a expressão de CD45 RA em *naïve* ( $CD45 RA^+$ ) e de memória ( $CD45 RA^-$ ). Painel E) o *gate* em linfócitos  $T CD8^+$  permitiu a análise da expressão da molécula de ativação CD25 pelas células. Fonte: autora.

#### 4.4.5 ANÁLISE DO TUBO 5

As células B foram classificadas em diversas subpopulações  $CD19^+$  pela combinação de anticorpos do Tubo 5, especialmente em relação a expressão de IgD, IgM e CD27, conforme a Figura 13.

**Figura 13.** Estratégias de *gate* na avaliação de subtipos de células B.

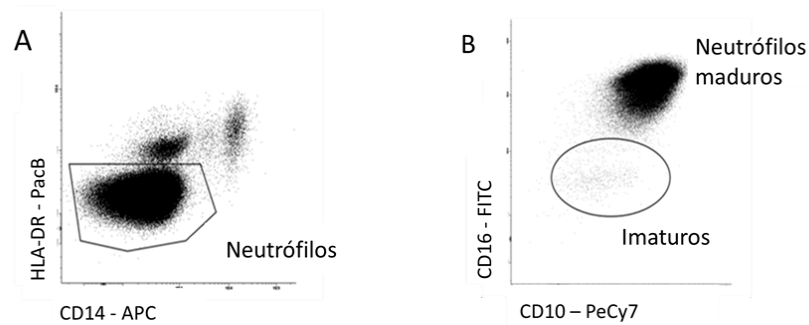


Painel A) as células B ( $CD19^+$ ) foram divididas em plasmablastos ( $CD38^{++} CD20^-$ ) e células B maduras ( $CD20^+$ ). Painel B) células B maduras classificadas de acordo com a expressão de imunoglobulina (IgD e IgM). Painel C) juntamente com a expressão de CD27, células  $IgD^+ IgM^+$  e  $IgD^- IgM^+$  foram subclassificadas em *non-switched naïve* ( $CD27^-$ ) e *non-switched memory* ( $CD27^+$ ) e as células  $IgM^-$  em *class-switched memory* ( $CD27^+$ ) e de memória com perda da expressão de CD27. Painel D) células  $IgM^+$  e  $CD27^-$  foram classificadas como células B de transição ( $CD24^{hi} CD38^{hi}$ ) e as células  $CD19^+ CD24^{hi} CD38^{hi}$  foram classificadas como células B reguladoras (sobrepostas na imagem). Fonte: autora.

#### 4.4.6 ANÁLISE DO TUBO 6

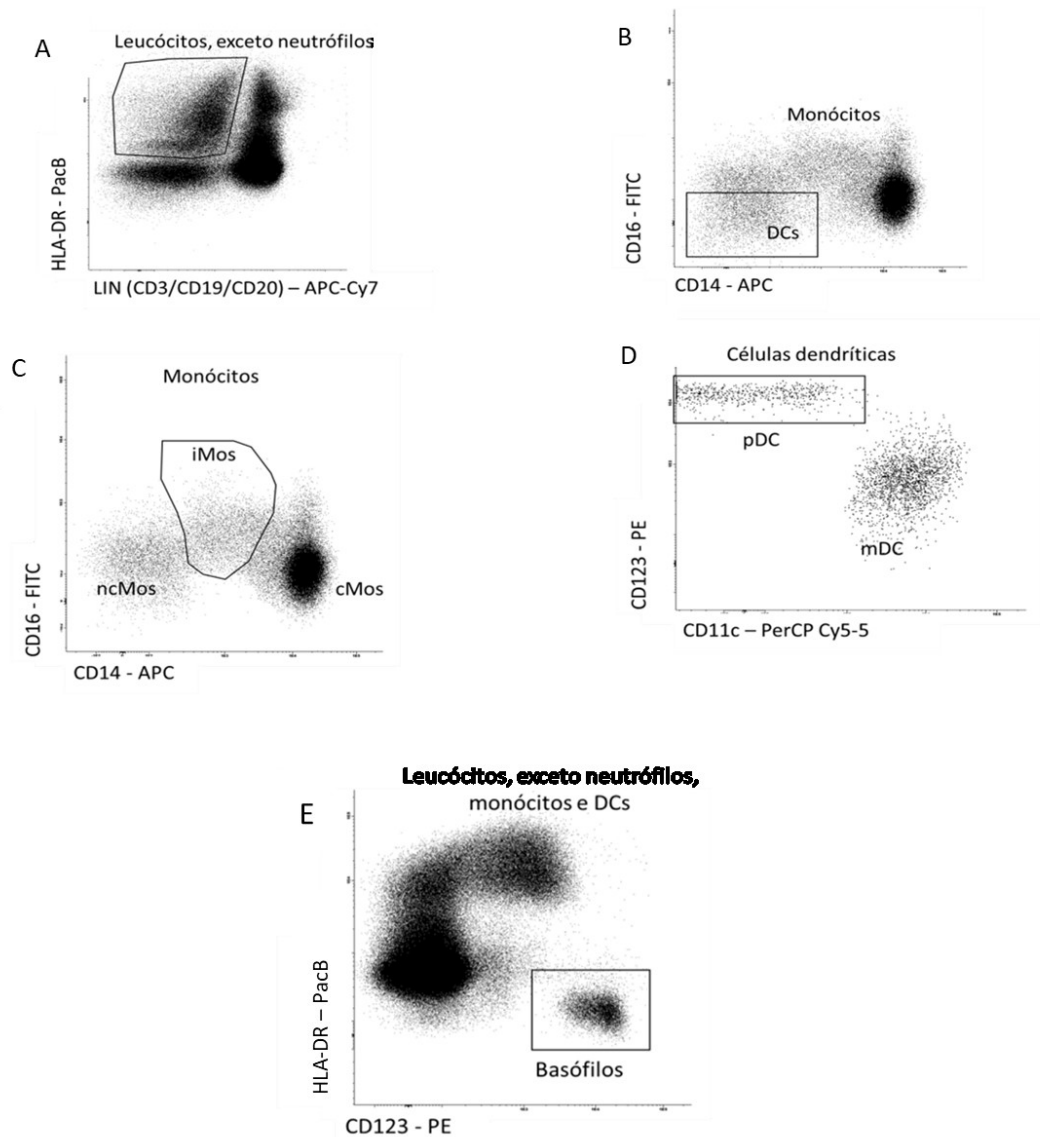
O Tubo 6 foi utilizado para avaliar os neutrófilos maduros e imaturos, subconjuntos de DCs (pDCs e mDCs), bem como de monócitos (cMos, nMos e iMos) e também os basófilos. As Figuras 14 e 15 mostram os *gates* utilizados nessas análises.

**Figura 14.** Estratégias de *gate* para a análise dos neutrófilos maduros e imaturos.



Painel A) neutrófilos foram selecionados em HLA-DR<sup>-</sup> e CD14<sup>-</sup>. Painel B) neutrófilos imaturos foram classificados pela ausência de expressão de CD16 e CD10. Fonte: autora.

**Figura 15.** Estratégias de *gate* para a análise dos subconjuntos de monócitos, DCs e para os basófilos.

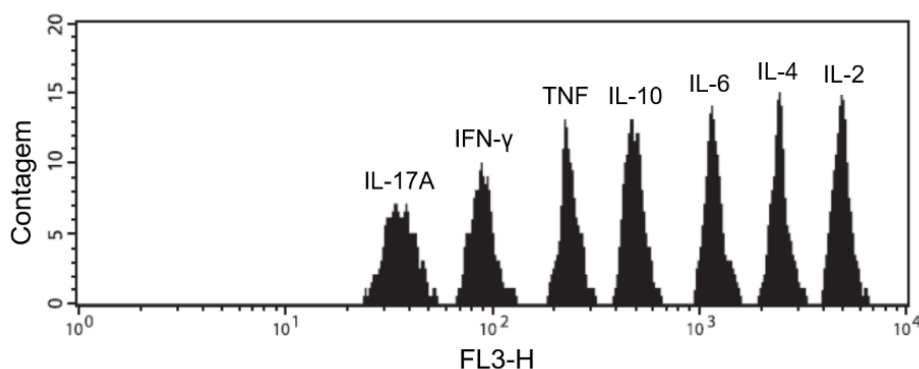


Painel A) a população selecionada não apresenta marcadores T e B, mas expressa HLA-DR, podendo corresponder a DCs ou monócitos. Painel B) DCs e monócitos foram separados de acordo com a expressão de CD16 e CD14. Painel C) monócitos classificados como clássicos, não clássicos e intermediários de acordo com a expressão de CD16 e CD14. Painel D) divisão de DC em plasmocitoides ( $CD123^+ CD11c^-$ ) e mieloides ( $CD123^- CD11c^+$ ). Painel E) basófilos identificados pela expressão de  $CD123^+$  e ausência de HLA-DR. Fonte: autora.

#### 4.5 ANÁLISE DAS CITOCINAS

Para a dosagem de citocinas, o plasma dos indivíduos foi separado em criotubos no momento do isolamento das células mononucleares. Imediatamente, os criotubos foram congelados a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Ao final de todas as coletas deste estudo, as amostras foram descongeladas e testadas utilizando o kit BD™ Cytometric Bead Array (CBA Human Th1/Th2/Th17) (Beckton Dickinson, EUA), por citometria de fluxo, de acordo com as instruções do fabricante. Este kit avalia as concentrações de IL-17A, IFN- $\gamma$ , TNF, IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2 utilizando esferas conjugadas com anticorpos de captura que se ligam às citocinas de interesse presentes nas amostras. Cada tipo de esfera possui diferentes intensidades de fluorescência (Figura 16), assim, é permitida a análise simultânea dos diferentes tipos de citocinas. Foi elaborada uma curva padrão com diluições que variaram de 0,0 pg/ml a 5.000,0 pg/ml e o *software* FCAP Array™ (Beckton Dickinson, EUA) calculou todas as concentrações de citocinas baseado nesta curva. Antes do ensaio, o citômetro de fluxo FACSCanto II (Beckton Dickinson, EUA) foi submetido à calibração com um reagente específico do kit CBA.

**Figura 16.** Histogramas de distribuição das sete populações de esferas em função de suas intensidades de fluorescência.



Fonte: Manual de instruções do kit BDTM Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit.

#### 4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados deste estudo foram analisados pelo programa IBM SPSS (versão 20.0, EUA). Inicialmente, as variáveis numéricas foram submetidas ao teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov. Os dados com distribuição paramétrica foram avaliados pelo teste t de

*Student*. Os dados de distribuição não paramétrica foram avaliados pelo teste de *Mann-Whitney U*. Foi considerado um nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ) e intervalos de confiança de 95%. A correlação entre as variáveis numéricas foi realizada pelo cálculo do coeficiente de correlação  $\rho$  de *Pearson*. Valores de  $\rho$  até 0,39 positivos ou negativos foram considerados correlação fraca; valores de  $\rho$  entre 0,40 a 0,69 positivos ou negativos foram considerados correlação moderada; valores de  $\rho$  entre 0,70 e 0,89 positivos ou negativos foram considerados correlação forte e valores de  $\rho$  acima de 0,9 positivos ou negativos foram considerados correlação muito forte (DEVORE, 2006).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO E EXAMES LABORATORIAIS

Os indivíduos avaliados foram classificados em dois grupos com características gerais semelhantes, como já mencionados: grupo exposto e grupo controle. A mediana de idade do grupo exposto foi de 50 anos, com intervalo de 29 a 72 anos e do grupo controle também foi de 50 anos, com intervalo de 32 a 66 anos. 72% dos participantes do grupo exposto eram homens e 28%, mulheres. No grupo controle, 67% eram homens e 33% mulheres. O tempo de exposição aos agrotóxicos variou de 15 a 57 anos, com mediana de 37,47 anos. Como moram na mesma cidade rural, os indivíduos do grupo exposto têm hábitos nutricionais semelhantes. Todos relataram o consumo de carnes, frutas e vegetais da produção local. Em relação aos equipamentos de proteção individual (EPI), 88% relataram o uso de dois ou mais EPIs, como botas, luvas, chapéus, máscaras ou roupas compridas, mas a utilização desses recursos não interferiu nos resultados deste estudo. As características gerais são mostradas na Tabela 5.

**Tabela 6.** Características gerais das populações avaliadas.

<b>Características</b>	<b>Grupo exposto</b>	<b>Grupo controle</b>
<b>Gênero</b>	72 % homens 28 % mulheres	67 % homens 33 % mulheres
<b>Idade (em anos)</b>	50,42 ± 13,51	50,90 ± 10,25
<b>Tempo de exposição a agrotóxicos (em anos)</b>	37,47 ± 26,16	_____
<b>Uso de EPI</b>	88 % sim 12 % não	_____

EPI: equipamento de proteção individual. Idade e exposição a agrotóxicos são mostrados como média ± desvio padrão. Grupo exposto (N = 40); grupo controle (N = 30). Fonte: autora.



## 5.1 EXAMES HEMATOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E HORMONAIS

Como mencionado no item 4.2, os agricultores passaram por avaliação laboratorial no HU-USC. Foram realizados na ULAC a determinação da atividade das colinesterases AChE e BChE, além de exames hematológicos, bioquímicos e hormonais.

As atividades de AChE e BChE mantiveram-se dentro dos valores de referência, com exceção de apenas um agricultor, com resultado para BChE de 6000,00 U/L. Os exames de quantificação de hemácias, hemoglobina, hematócrito e plaquetas não apresentaram nenhuma alteração dentre os participantes. A glicemia de jejum foi o exame que apresentou o maior número de resultados acima dos valores considerados normais: 19 indivíduos entre 100 e 125 mg/dL e 2 indivíduos com valores acima de 125 mg/dL, ou seja 52,5% dos agricultores apresentaram alterações. Dentre eles, oito apresentaram também alteração de HbA1c (20% dos indivíduos). Apesar dos resultados, apenas três agricultores se autodeclararam diabéticos no QUESTIONÁRIO HISTÓRICO DE SAÚDE (APÊNDICE C). Quanto à avaliação das enzimas hepáticas, foram encontrados em quatro agricultores resultados aumentados da GGT, dois de AST e 11 de ALT. Três indivíduos apresentaram alterações concomitantes nas três enzimas, porém os mesmos não declararam problemas de saúde no questionário. Na avaliação da função renal foram observados 12 indivíduos com ureia aumentada, no entanto a creatinina manteve-se dentro dos valores referenciais em todos os agricultores. Sete indivíduos apresentaram valores da PCR aumentados. Os exames hormonais de TSH e TTEL de homens e mulheres não apresentaram resultados fora dos valores de referência. Os resultados estão disponíveis na Tabela 6.

**Tabela 7.** Avaliações hematológicas, bioquímicas e hormonais dos agricultores.

<b>Exames</b>	<b>Resultados</b>	<b>Valores de referência</b>
<b>AChE (U/mmol Hb)</b> média ± DP	497,90 ± 59,19	352,00 a 779,00 (U/mmol Hb)
<b>BChE (U/L)</b> mediana (intervalo)	14000,00 (6000,00 – 18000)	7000,00 a 19000,00 (U/L)
<b>Hemácias/μL</b> média ± DP	4,89 ± 0,39	4,2 a 5,9 milhões/μL
<b>Hemoglobina (g/dL)</b> média ± DP	14,72 ± 1,27	13,0 a 18,0 g/dL

**Tabela 6.** Avaliações hematológicas, bioquímicas e hormonais dos agricultores.  
(continua)

<b>Exames</b>	<b>Resultados</b>	<b>Valores de referência</b>
<b>Hematócrito (%)</b> média ± DP	43,69 ± 3,14	38 a 52%
<b>Plaquetas/μL</b> média ± DP	226860,47 ± 48735,72	140000 a 450000/μL
<b>HbA1c (%)</b> mediana (intervalo)	5,35 (4,40 – 11,20)	4,7% a 5,6%
<b>Glicemia (mg/dL)</b> mediana (intervalo)	99,50 (79,00 – 357,00)	Inferior a 99,00 mg/dL
<b>ALT (U/L)</b> mediana (intervalo)	32 (18 - 134)	Até 38 U/L
<b>AST (U/L)</b> mediana (intervalo)	23 (12 - 63)	Até 41 U/L
<b>GGT (U/L)</b> mediana (intervalo)	31 (18 – 177)	8 a 61 U/L
<b>Creatinina (mg/dL)</b> média ± DP	0,86 ± 0,15	0,7 a 1,3 mg/dL
<b>Ureia (mg/dL)</b> média ± DP	40,92 ± 11,90	10 a 45 mg/dL
<b>PCR (mg/L)</b> mediana (intervalo)	2,55 (0,80 – 12,00)	Até 3,00 mg/L
<b>TSH (UI/mL)</b> média ± DP	2,29 ± 1,37	0,34 a 5,60 UI/mL
<b>TTEL (Mulheres) (ng/dL)</b> média ± DP	26,81 ± 13,00	Até 48,93 ng/dL
<b>TTEL (Homens) (ng/dL)</b> media ± DP	403,32 ± 135,18	165 a 753 ng/dL

AChE: acetilcolinesterase; BChE: butirilcolinesterase; HbA1c: hemoglobina glicosilada; ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase; GGT: gama glutamiltransferase; PCR: proteína C reativa; TSH: hormônio tireoestimulante; TTEL: testosterona livre. Fonte: sistema DATATOX.

## 5.2 AGROTÓXICOS UTILIZADOS

Os agricultores relataram o uso de 62 grupos químicos diferentes de agrotóxicos, sendo os principais: piretroides, ditiocarbamato, glifosato, triazol, avermectina, benzimidazol, fusilade, paraquat e cimoxanil + mancozebe, que são utilizados por mais da metade da população estudada. A Tabela 7 mostra a lista completa de agrotóxicos citados com as

respectivas classificações toxicológicas (tanto a antiga quanto a nova reclassificação adotada pela ANVISA em 2019) e o percentual de agricultores que os utiliza. Destaca-se o metilparation, de comercialização proibida, ainda ser citado por 4,7% dos agricultores.

**Tabela 8.** Agrotóxicos utilizados pelos trabalhadores rurais e classificações toxicológicas.

<b>Agrotóxico</b>	<b>Classificação toxicológica antiga da ANVISA</b>	<b>Reclassificação toxicológica da ANVISA (a partir de 2019)</b>	<b>Utilização (%)</b>
<b>Piretroides</b>	Classe I	Categoria 4	79,1
<b>Ditiocarbamato</b>	Classe II	Categoria 5	74,4
<b>Glifosato</b>	Classe III	Categoria 4	74,4
<b>Triazol</b>	Classe III	Categoria 5	72,1
<b>Avermectina</b>	Classe I	Categoria 4	60,5
<b>Benzimidazol</b>	Classe III	Categoria 5	60,5
<b>Fusilade</b>	Classe III	Categoria 5	58,1
<b>Paraquat</b>	Classe I	Categoria 1	55,8
<b>Cimoxanil + mancozebe</b>	Classe III	Categoria 5	53,5
<b>Neonicotinoide + piretroide</b>	Classe II	Categoria 4	48,8
<b>Acilalaninato + ditiocarbamato</b>	Classe I	Categoria 5	46,5
<b>Casugamicina</b>	Classe III	Categoria 5	46,5
<b>Mancozebe</b>	Classe II	Categoria 5	46,5
<b>Metilcarbamato</b>	Classe I	Categoria 3	46,5
<b>Isoftalonitrila</b>	Classe II	Categoria 4	46,5
<b>Benzotiadiazol</b>	Classe III	Categoria 5	44,2
<b>Oxadiazina</b>	Classe III	Categoria 4	44,2

**Tabela 7.** Agrotóxicos utilizados pelos trabalhadores rurais e classificações toxicológicas.  
(continua)

<b>Agrotóxico</b>	<b>Classificação toxicológica antiga da ANVISA</b>	<b>Reclassificação toxicológica da ANVISA (a partir de 2019)</b>	<b>Utilização (%)</b>
<b>Triazinamina</b>	Classe IV	Categoria 4	39,5
<b>Estrobilurina</b>	Classe IV	Categoria 5	37,2
<b>Neonicotinoide</b>	Classe III	Categoria 4	37,2
<b>Difenoconazol + azoxistrobina</b>	Classe III	Categoria 5	34,9
<b>Acefato</b>	Classe III	Categoria 5	30,2
<b>Carbamato + benzamida piridina</b>	Classe II	Categoria 5	30,2
<b>Cipermetrina + profenofós</b>	Classe III	Categoria 4	27,9
<b>Antranilamida</b>	Classe III	Categoria 5	25,6
<b>Inseticida biológico</b>	Classe IV	Não classificado	25,6
<b>Metalaxyl-M + mancozebe</b>	Classe I	Categoria 3	25,6
<b>Dicarboximida</b>	Classe I	Categoria 2	23,3
<b>Fenilpiridinilamina</b>	Classe I	Categoria 5	23,3
<b>Triazol + estrobilurina</b>	Classe III	Categoria 4	23,3
<b>2,4D</b>	Classe I	Categoria 4	20,9
<b>Tiametoxam</b>	Classe II	Categoria 5	20,9
<b>Tiofanato metílico + clorotalonil</b>	Classe II	Categoria 3	20,9
<b>Antranilamida + avermectinas</b>	Classe II	Categoria 4	18,6
<b>Antranilamida + neonicotinoide</b>	Classe III	Categoria 5	18,6
<b>Clorotalonil + cloreto de cobre</b>	Classe I	Categoria 4	18,6

**Tabela 7.** Agrotóxicos utilizados pelos trabalhadores rurais e classificações toxicológicas.  
(continua)

<b>Agrotóxico</b>	<b>Classificação toxicológica antiga da ANVISA</b>	<b>Reclassificação toxicológica da ANVISA (a partir de 2019)</b>	<b>Utilização (%)</b>
<b>Mandipropamida</b>	Classe II	Categoria 5	18,6
<b>Clorantraniliprole</b>	Classe IV	Não classificado	16,3
<b>Imidacloprido</b>	Classe III	Categoria 4	16,3
<b>Formetanato</b>	Classe II	Categoria 2	14,0
<b>Procimidona</b>	Classe II	Categoria 5	14,0
<b>Clorpirifos</b>	Classe I	Categoria 3	11,6
<b>Morfolina</b>	Classe II	Categoria 4	11,6
<b>Metilcarbamato de oxima</b>	Classe I	Categoria 2	11,6
<b>Picloram + 2,4D</b>	Classe I	Categoria 4	11,6
<b>Spinetoram</b>	Classe III	Categoria 5	11,6
<b>Ureia</b>	Classe III	Categoria 5	9,3
<b>Cetoenol</b>	Classe III	Categoria 5	9,3
<b>Piretroide + antranilamida</b>	Classe II	Categoria 4	9,3
<b>Fenamidona</b>	Classe III	Categoria 5	7,0
<b>Fenitrotona</b>	Classe II	Categoria 4	7,0
<b>Homoalanina substituída</b>	Classe I	Categoria 4	7,0
<b>Éter difenílico</b>	Classe I	Categoria 4	7,0
<b>Pimetrozina</b>	Classe I	Categoria 5	7,0
<b>Estrobilurina + triazol + ditiocarbamato</b>	Classe II	Categoria 5	4,7
<b>Ciclohexeno-dicarboximida</b>	Classe II	Categoria 5	4,7
<b>Metil-paration</b>	Classe I	Comercialização proibida*	4,7
<b>Fungicida biológico</b>	Classe III	Não classificado	2,3

**Tabela 7.** Agrotóxicos utilizados pelos trabalhadores rurais e classificações toxicológicas. (conclusão)

Agrotóxico	Classificação toxicológica antiga da ANVISA	Reclassificação toxicológica da ANVISA (a partir de 2019)	Utilização (%)
Metamitrona	Classe IV	Categoria 4	2,3
Picloram	Classe I	Categoria 4	2,3

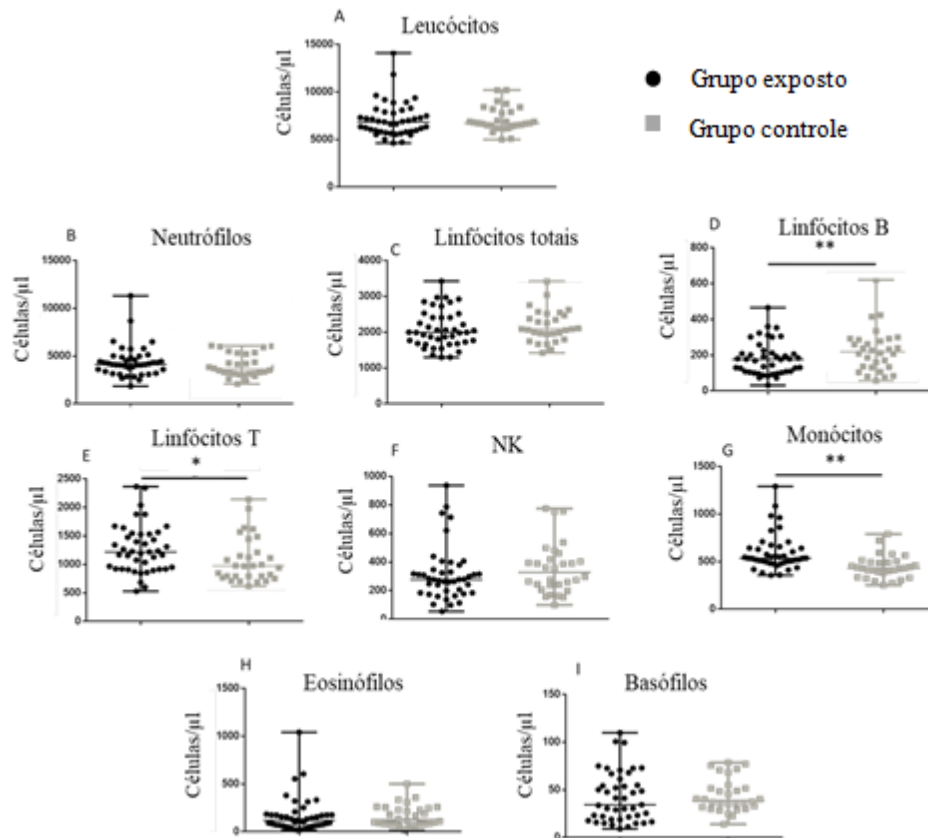
Classe I: Extremamente tóxico; Classe II: Altamente tóxico; Classe III: Moderadamente tóxico; Classe IV: Pouco tóxico; Categoria 1 – Produto Extremamente Tóxico; Categoria 2 – Produto Altamente Tóxico; Categoria 3 – Produto Moderadamente Tóxico; Categoria 4 – Produto Pouco Tóxico; Categoria 5 – Produto Improvável de Causar Dano Agudo; Não classificado – Produto não classificado. \*: Comercialização proibida pela RDC Nº 56 de 11 de dezembro de 2015. Fonte: autora e ANVISA, 2019.

### 5.3 CELULARIDADE TOTAL

Na avaliação dos valores absolutos de leucócitos totais por  $\mu\text{l}$  de SP, constatou-se não haver diferenças significativas entre o grupo exposto e o grupo controle, como demonstrado na Figura 16. Entretanto, analisando os linfócitos B, linfócitos T e monócitos, foram observados valores diferentes entre os grupos. O grupo exposto apresentou diminuição do número absoluto de linfócitos B ( $p < 0,01$ ) e, em contrapartida, o número de linfócitos T se mostrou significativamente elevado nesse mesmo grupo ( $p < 0,05$ ). Com relação aos monócitos, essas células também apresentaram valores absolutos significativamente aumentados no grupo exposto ( $p < 0,01$ ).

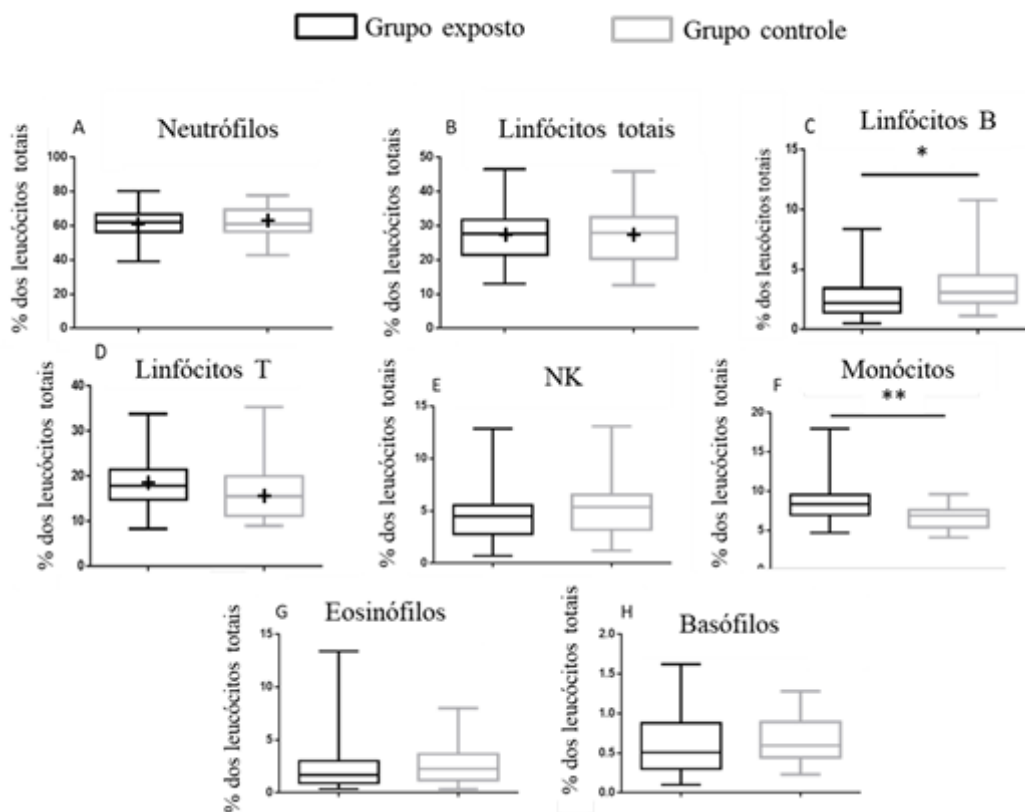
Também foram analisados os valores relativos das células, ou seja, o percentual em relação ao número de leucócitos totais. Como se pode observar na Figura 17, os linfócitos B e os monócitos mais uma vez apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos. Os linfócitos B apresentaram valores significativamente diminuídos ( $p < 0,05$ ), enquanto os monócitos encontraram-se significativamente aumentados no grupo exposto ( $p < 0,01$ ) em comparação ao grupo controle.

**Figura 17.** Comparação da celularidade absoluta entre os grupos avaliados.



Valores representados em quantidades de células por  $\mu\text{l}$  de sangue total. As linhas horizontais internas em cada grupo representam as medianas; *whiskers* representam valores mínimos e máximos. Painéis D e G:  $**p < 0,01$ ; painel E:  $*p < 0,05$  (*Mann-Whitney test*). Grupo exposto (N = 40); grupo controle (N = 30). Fonte: autora.

**Figura 18.** Comparação da celularidade relativa entre os grupos avaliados.

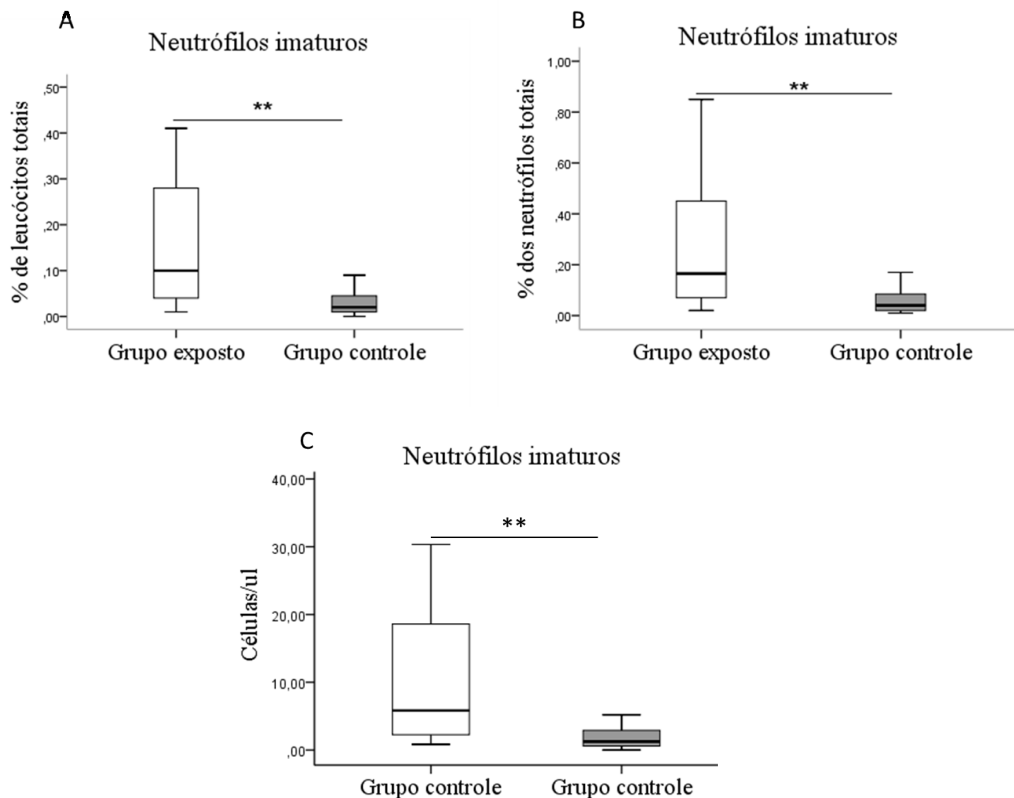


Valores representados como porcentagens considerando-se os leucócitos totais como 100%. As linhas horizontais internas em cada grupo representam as medianas; *boxes* e *whiskers* representam, respectivamente, os interquartis e valores mínimos e máximos. Painéis A, B e D apresentaram dados paramétricos, sendo a média representada por um “+” no gráfico de caixa (teste t de *Student*). Painel C: \* $p < 0,05$ ; painel F: \*\* $p < 0,01$ ; (*Mann-Whitney test*). Grupo exposto (N = 40); grupo controle (N = 30). Fonte: autora.

#### 5.4 NEUTRÓFILOS IMATUROS E MADUROS

Como visto no item anterior, os grupos avaliados não diferiram quanto aos números absolutos e relativos de neutrófilos, porém quando avaliamos a maturação dessas células foram obtidos resultados importantes. A população imatura de neutrófilos foi significativamente mais elevada no grupo exposto em três cenários considerados: porcentagem dentre os leucócitos totais ( $p < 0,01$ ), porcentagem dentre os neutrófilos totais ( $p < 0,01$ ) e no número absoluto de células por  $\mu\text{l}$  de SP ( $p < 0,01$ ). A Figura 18 ilustra essas três situações.



**Figura 19.** Celularidade relativa e absoluta da população imatura de neutrófilos.

Painel A: valores representados como porcentagens considerando-se os leucócitos totais como 100%; Painel B: valores representados como porcentagens considerando-se os neutrófilos totais como 100%. Painel C: valores representados em quantidade de células por  $\mu$ l de sangue total. **\*\*** $p < 0,01$  (*Mann-Whitney test*). Grupo exposto (N = 40); grupo controle (N = 30). Fonte: autora.

Já a população madura de neutrófilos apresentou diferença estatística entre os grupos apenas quando considerados os neutrófilos totais como 100 %, conforme mostra a Tabela 8.

**Tabela 9.** Celularidade relativa e absoluta da população de neutrófilos maduros.

Células	Grupo exposto	Grupo controle	<i>p value</i>
<b>Neutrófilos maduros</b> % dos leucócitos totais	56,28 $\pm$ 9,93	57,40 $\pm$ 7,98	0,64
<b>Neutrófilos maduros</b> % dos neutrófilos totais	<b>99,68 <math>\pm</math> 0,37</b>	<b>99,95 <math>\pm</math> 0,07</b>	<b>0,00*</b>
<b>Neutrófilos maduros</b> células/ $\mu$ l	4179,55 $\pm$ 1611,04	3859,51 $\pm$ 1114,93	0,50

Valores representados como média  $\pm$  desvio padrão (teste t de *Student*). \*  $p < 0,001$ . Grupo exposto (N = 40); grupo controle (N = 30). Fonte: autora.

## 5.5 MONÓCITOS CLÁSSICOS, INTERMEDIÁRIOS E NÃO CLÁSSICOS

Os monócitos, que se mostraram elevados em números absolutos e percentuais no grupo exposto no item 5.3, também foram classificados em três subpopulações distintas: clássicos, intermediários e não clássicos. A população de monócitos clássicos foi a que se encontrou em maiores quantidades no SP em ambos os grupos. Porém no grupo exposto, essa quantidade ainda foi significativamente maior em comparação ao grupo controle ( $p < 0,01$ ), conforme mostra a Tabela 9. Os números de monócitos intermediários e não clássicos não diferiram entre os grupos.

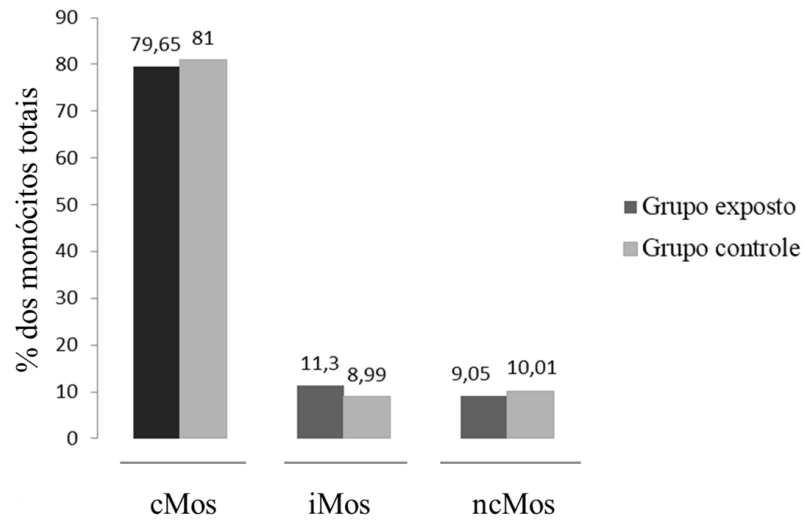
**Tabela 10.** Valores absolutos de monócitos clássicos, intermediários e não clássicos..

<b>Células/<math>\mu</math>l</b>	<b>Grupo exposto</b>	<b>Grupo controle</b>	<b><i>p</i> value</b>
<b>cMos</b>	<b>474,65 (187,47 – 924,96)</b>	<b>348,97 (199,41–647,66)</b>	<b>0,00**</b>
<b>iMos</b>	44,17 (9,34–326,27)	38,31 (13,80–75,04)	0,28
<b>ncMos</b>	57,72 (2,77–105,06)	37,86 (11,85–83,40)	0,17

Valores representados como mediana (intervalo). cMos: monócitos clássicos; iMos: monócitos intermediários; ncMos: monócitos não clássicos. \*\* $p < 0,01$  (*Mann-Whitney test*). Grupo exposto (N = 40); grupo controle (N = 30). Fonte: autora.

As subpopulações de monócitos também foram avaliadas quanto aos percentuais em relação ao compartimento monocítico total. A Figura 19 mostra que não houve diferença estatística das proporções entre os grupos.

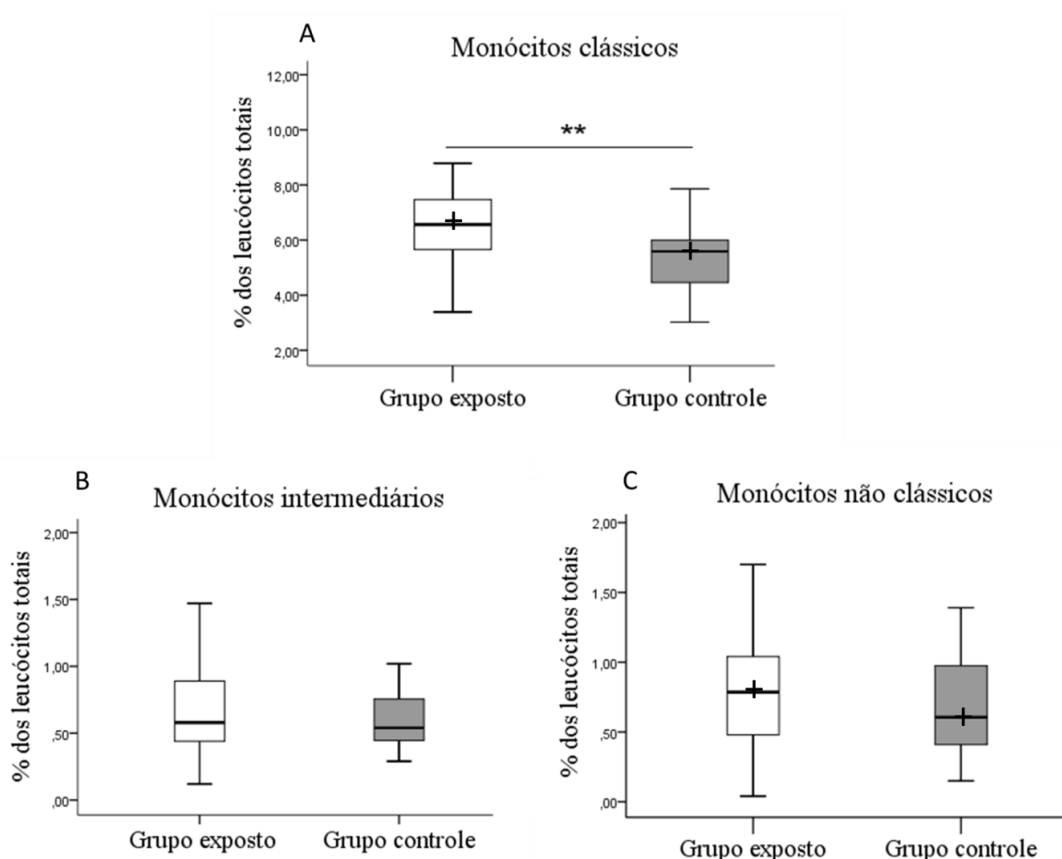
**Figura 20.** Proporção das subpopulações de monócitos no compartimento monocítico.



Valores representados como porcentagens médias considerando-se os monócitos totais como 100%. cMos: monócitos clássicos; iMos: monócitos intermediários; ncMos: monócitos não clássicos. cMos e iMos avaliados pelo *Mann Whitney test* e ncMos pelo teste t de *Student*. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos. Grupo exposto (N = 40); grupo controle (N = 30). Fonte: autora.

Por outro lado, ao considerarmos os leucócitos totais como 100%, os monócitos clássicos mantiveram-se em maior proporção no grupo exposto ( $p < 0,01$ ), enquanto os monócitos intermediários e não clássicos não apresentaram diferenças. A Figura 20 representa esses dados.

**Figura 21.** Proporção das subpopulações de monócitos em relação aos leucócitos totais.



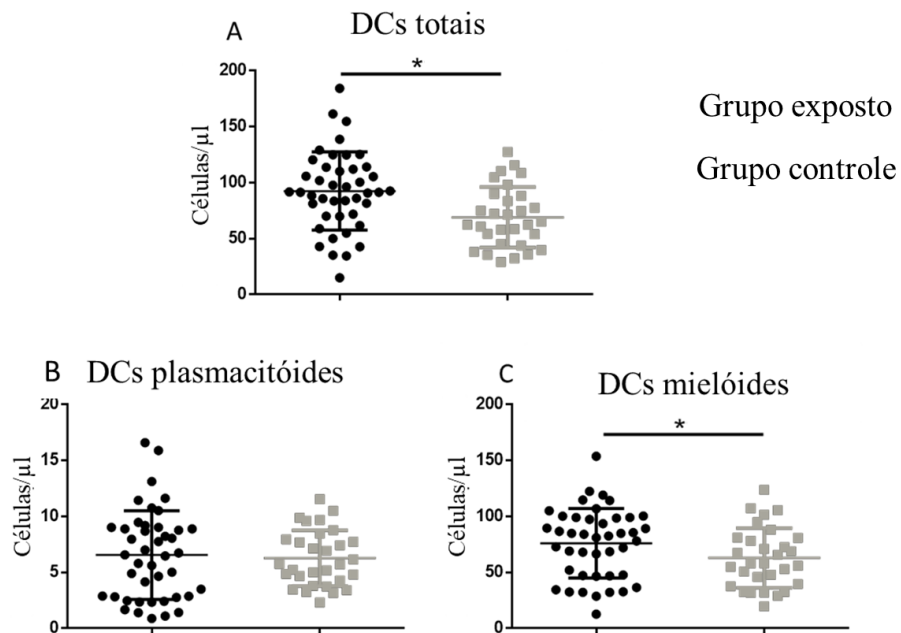
Valores representados como porcentagens considerando-se os leucócitos totais como 100%.

Painéis A e C apresentaram dados paramétricos, sendo a média representada por um “+” no gráfico de caixa (teste t de *Student*). Painel B avaliado por *Mann-Whitney test*. No Painel A,  $**p < 0,01$ . Grupo exposto (N = 40); grupo controle (N = 30). Fonte: autora.

## 5.6 CÉLULAS DENDRÍTICAS

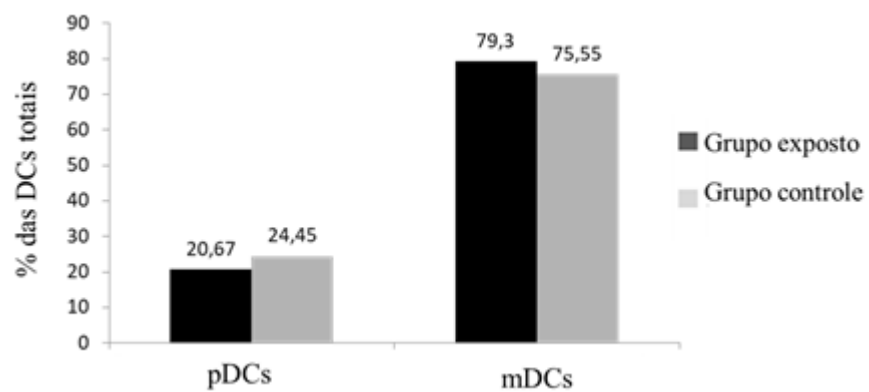
As DCs totais foram quantificadas em células por  $\mu\text{l}$  de SP, assim como suas subpopulações plasmocitóides e mielóides. Verificou-se que os valores de mDCs estavam elevados no grupo exposto ( $p < 0,05$ ), elevando também os valores de DCs totais ( $p < 0,05$ ) (Figura 21), visto que as mDCs correspondem à grande maioria dessas células. A Figura 22 mostra os valores percentuais das pDCs e mDCs em relação às DC totais.

**Figura 22.** Valores absolutos de células dendríticas totais e das subpopulações plasmacitóide e mielóide.



Valores representados em quantidades de células por  $\mu$ l de sangue total. As linhas horizontais internas em cada grupo representam as medianas; *whiskers* representam valores mínimos e máximos. DCs: células dendríticas. Painéis A e C:  $*p < 0,05$  (*Mann-Whitney test*). Grupo exposto (N = 40); grupo controle (N = 30). Fonte: autora.

**Figura 23.** Valores relativos das pDCs e mDCs considerando as DC totais.



Valores representados como porcentagens considerando-se as células dendríticas totais como 100%. DCs: células dendríticas; pDCs: células dendríticas plasmocitóides; mDCs: células dendríticas mielóides. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos (teste t de *Student*). Grupo exposto (N = 40); grupo controle (N = 30). Fonte: autora.

## 5.7 LINFÓCITOS T E SUAS SUBPOPULAÇÕES

O aumento do número absoluto de linfócitos T totais no grupo exposto já foi demonstrado no item 5.3, entretanto outras análises referentes a essa população foram realizadas. Inicialmente, as subpopulações T (T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup>, T  $\gamma\delta$ <sup>+</sup>, T DP e T DN) foram avaliadas quanto a sua distribuição (considerando o total de linfócitos T como 100%), porém não foram encontradas diferenças entre os grupos. Os resultados estão dispostos na Tabela 10.

**Tabela 11.** Valores percentuais de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup>, T  $\gamma\delta$ <sup>+</sup>, T DP e T DN.

Células (%)	Grupo exposto (% dos linfócitos T)	Grupo controle (% dos linfócitos T)	<i>p value</i>
T CD4 <sup>#</sup>	40,90 (21,21 – 61,92)	34,49 (23,04 - 45,18)	0,06
T CD8 <sup>¶</sup>	22,19 ± 8,26	21,13 ± 6,70	0,98
T $\gamma\delta$ <sup>¶</sup>	3,97 ± 2,70	3,69 ± 2,08	0,97
T DP <sup>#</sup>	0,82 (0,07 – 14,77)	0,75 (0,20 – 6,44)	0,66
T DN <sup>#</sup>	0,39 (0,11 – 14,92)	0,40 (0,18 – 0,70)	0,84

¶: valores representados como média ± desvio padrão (teste t de *Student*); #: valores representados como mediana (intervalo) (*Mann-Whitney test*). Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos. DP: duplamente positivos; DN: duplamente negativos. Grupo exposto (N = 40); grupo controle (N = 30). Fonte: autora.

Adicionalmente, foram analisadas as subpopulações: *naïve*, CM, EM e EM RA dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>. A Tabela 11 mostra a comparação dos valores absolutos dessas células entre os grupos avaliados. Os linfócitos T CD8<sup>+</sup> CM mostraram-se significativamente aumentados no grupo exposto ( $p < 0,05$ ). Da mesma forma, os linfócitos T CD8<sup>+</sup> EM encontraram-se em maior número nesse mesmo grupo ( $p < 0,05$ ). O contrário ocorreu com os valores de linfócitos T CD8<sup>+</sup> EM RA, já que houve diminuição significativa no grupo exposto ( $p < 0,05$ ). Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os valores dos demais subtipos celulares.

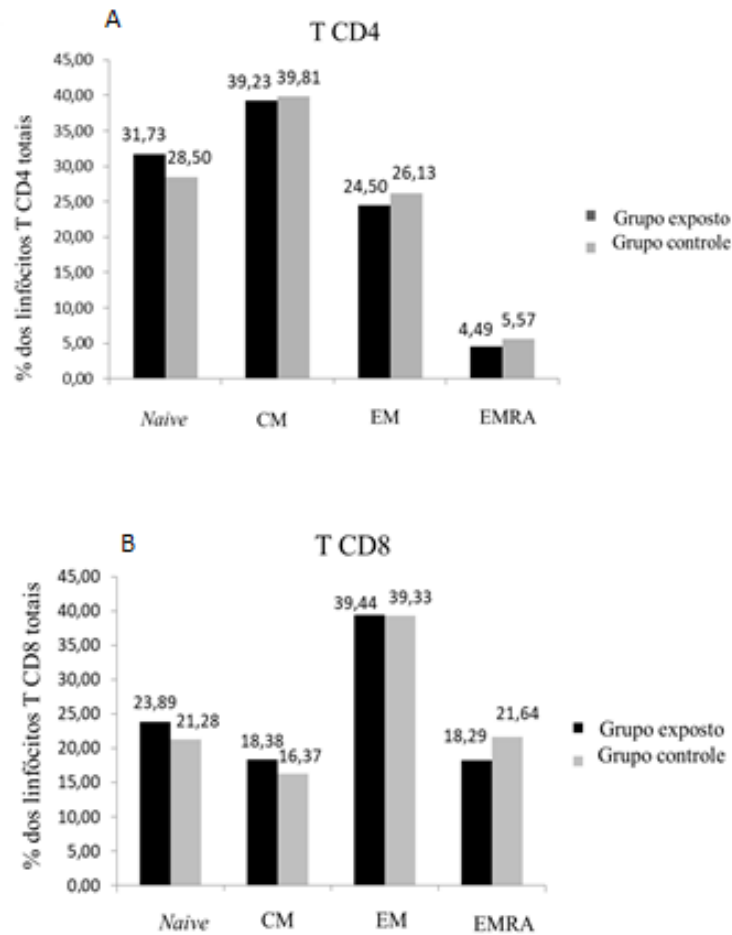
**Tabela 12.** Valores absolutos das subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>.

<b>Células/<math>\mu</math>l</b>	<b>Grupo exposto Mediana (intervalo)</b>	<b>Grupo controle Mediana (intervalo)</b>	<b><i>p</i> value</b>
T CD4 <sup>+</sup> <i>naïve</i>	241,02 (56,29 - 825,71)	190,88 (60,46 - 504,67)	0,41
T CD4 <sup>+</sup> CM	265,42 (3,54 - 769,24)	280,42 (142,37 - 479,54)	0,95
T CD4 <sup>+</sup> EM	184,54 (2,02 - 434,61)	170,03 (105,18 - 359,64)	0,98
T CD4 <sup>+</sup> EM RA	19,73 (1,43 - 179,39)	28,06 (5,94 - 529,76)	0,29
T CD8 <sup>+</sup> <i>naïve</i>	85,36 (8,10 - 354,51)	90,39 (34,28 - 532,08)	0,31
T CD8 <sup>+</sup> CM	<b>69,70 (2,10 - 291,08)</b>	<b>46,32 (14,40 - 190,52)</b>	<b>0,02*</b>
T CD8 <sup>+</sup> EM	<b>148,79 (1,73 - 527,08)</b>	<b>102,01 (30,97 - 339,70)</b>	<b>0,01*</b>
T CD8 <sup>+</sup> EM RA	<b>65,53 (11,24 - 374,81)</b>	<b>134,44 (37,42 - 382,71)</b>	<b>0,01*</b>

Valores representados em quantidades de células por  $\mu$ l de sangue total. CM: *central memory*; EM: *effector memory*; EM RA: *effector memory RA*. \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$  (*Mann-Whitney test*). Grupo exposto (N = 40); grupo controle (N = 30). Fonte: autora.

Essas mesmas subpopulações celulares também foram avaliadas quanto ao seu percentual considerando como 100% os linfócitos T CD4<sup>+</sup> totais e T CD8<sup>+</sup> totais, porém não houve diferença estatística entre as populações estudadas, conforme ilustra a Figura 23.

**Figura 24.** Proporção dos valores relativos de linfócitos T *naïve*, T<sub>CM</sub>, T<sub>EM</sub> e T<sub>EMRA</sub> nas populações T CD4 e T CD8.



Resultados expressos em porcentagem média, considerando os valores de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (Painel A) e T CD8<sup>+</sup> (Painel B) como 100%. CM: *central memory*; EM: *effector memory*; EM RA: *effector memory RA*<sup>+</sup>. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos (*Mann-Whitney test*). Grupo exposto (N = 40); grupo controle (N = 30). Fonte: autora.

Os marcadores de ativação CD57, HLA-DR, CD45 RA foram avaliados para as populações T CD4 e T CD8, além do CD25 para os T CD8, porém não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos. A Tabela 12 mostra os resultados.



**Tabela 13.** Distribuição dos marcadores de ativação nos linfócitos T CD4 e T CD8.

Células/ $\mu$ l	Grupo exposto	Grupo controle	<i>p</i> value
TCD4 DR <sup>+</sup> ¶	64,36 $\pm$ 27,11	65,45 $\pm$ 34,02	0,88
TCD4 CD57 <sup>+</sup> #	21,210 (3,870 - 154,640)	27,130 (1,580 - 555,550)	0,67
TCD4 CD57 <sup>+</sup> RA <sup>+</sup> #	3,550 (0,590 - 99,570)	3,410 (0,070 - 515,310)	0,70
TCD4 CD57 <sup>+</sup> RA <sup>-</sup> #	15,500 (1,860 - 122,880)	18,500 (1,510 - 64,890)	0,66
TCD4 CD28 <sup>+</sup> ¶	94,90 $\pm$ 5,53	93,90 $\pm$ 8,34	0,17
TCD4 CD28 <sup>-</sup> #	13,560 (0,000 - 139,220)	12,475 (0,200 - 548,530)	0,91
TCD8 DR <sup>+</sup> #	104,07 (8,77 - 441,43)	88,61 (21,23 - 263,29)	0,37
T CD8 CD57 <sup>+</sup> #	96,02 (11,83 - 459,07)	97,55 (18,56 - 376,42)	0,93
T CD8 CD57 <sup>+</sup> RA <sup>+</sup> #	64,45 (7,51 - 315,96)	78,14 (9,04 - 238,51)	0,35
T CD8 CD57 <sup>+</sup> RA <sup>-</sup> #	21,53 (0,13 - 271,07)	27,27 (0,50 - 137,91)	0,96
T CD8 CD28 <sup>+</sup> #	234,11 (34,35 - 595,09)	227,71 (120,52 - 635,83)	0,75
T CD8 CD28 <sup>-</sup> ¶	43,30 $\pm$ 18,46	39,88 $\pm$ 14,14	0,32
T CD8 CD57 <sup>+</sup> CD28 <sup>+</sup> #	6,88 (1,62 - 46,29)	9,44 (0,82 - 37,16)	0,30
T CD8 CD57 <sup>+</sup> CD28 <sup>-</sup> #	83,90 (7,44 - 423,27)	85,15 (12,18 - 367,34)	0,97
T CD8 CD25 <sup>+</sup> #	6,47 (1,28 - 301,76)	5,93 (1,95 - 37,98)	0,45

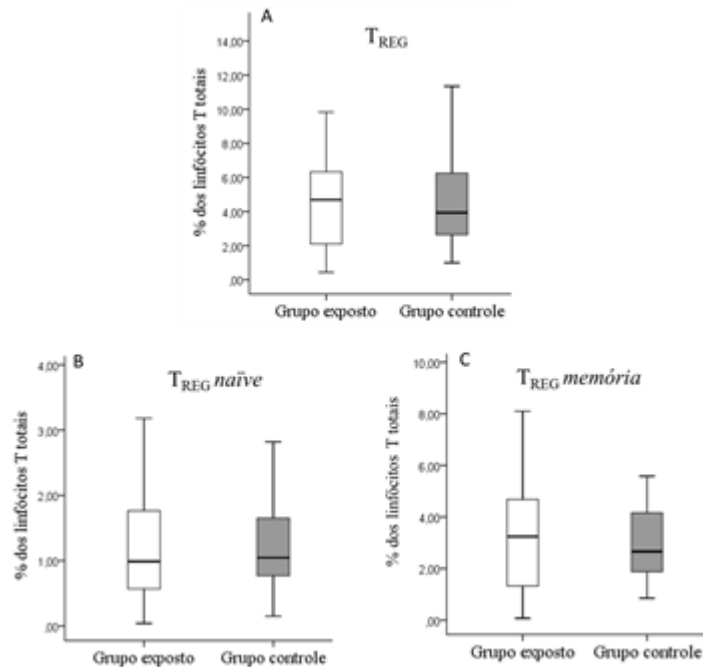
Valores representados em quantidades de células por  $\mu$ l de sangue total. ¶: valores representados como média  $\pm$  desvio padrão (teste t de *Student*); #: valores representados como mediana (intervalo) (*Mann-Whitney test*). Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos. Grupo exposto (N = 40); grupo controle (N = 30). Fonte: autora.

Ainda considerando os linfócitos T, foi realizada a avaliação da população T<sub>REG</sub> total, T<sub>REG</sub> *naïve* e T<sub>REG</sub> memória. Foram considerados os números absolutos de células por  $\mu$ l de SP (Tabela 13) e o percentual das células considerando os linfócitos T totais como 100% (Figura 24). No entanto, em nenhum desses cenários houve diferença significativa entre os grupos.

**Tabela 14.** Valores absolutos das células T<sub>REG</sub> e das populações *naïve* e memória.

Células/ $\mu$ l	Grupo exposto		Grupo controle		<i>p</i> value
	Mediana	(intervalo)	Mediana	(intervalo)	
T <sub>REG</sub>	34,89	(2,86 - 304,80)	28,19	(12,01 - 82,05)	0,67
T <sub>REG</sub> <i>naïve</i>	9,10	(0,33 - 294,96)	7,00	(1,70 - 43,62)	0,83
T <sub>REG</sub> memória	22,37	(0,71 - 56,93)	17,36	(6,79 - 68,52)	0,75

Valores representados em quantidades de células por  $\mu$ l de sangue total. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos (*Mann-Whitney test*). Grupo exposto (N = 40); grupo controle (N = 30). Fonte: autora.

**Figura 25.** Proporção das populações de T<sub>REG</sub> em relação aos linfócitos T totais.

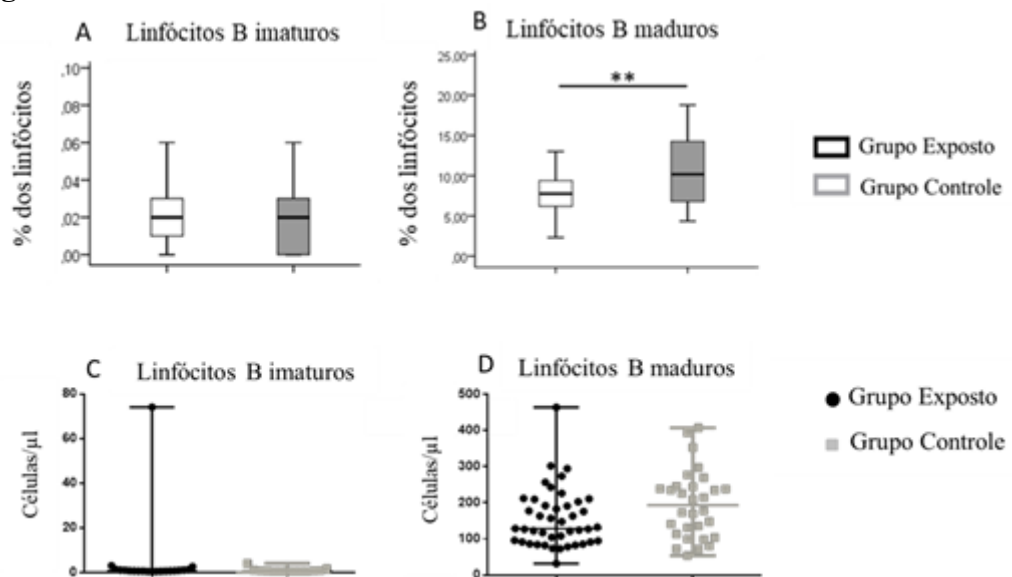
Resultados expressos em porcentagem de células, considerando os valores de linfócitos T totais como 100%. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos (*Mann-Whitney test*). Grupo exposto (N = 40); grupo controle (N = 30). Fonte: autora.

## 5.8 LINFÓCITOS B E SUAS SUBPOPULAÇÕES

A diminuição dos linfócitos B totais circulantes no grupo exposto já foi demonstrada no item 5.3, contudo ainda referente a essas células, foram avaliadas as subpopulações de linfócitos B imaturos, B maduros e seus estágios maturativos, B<sub>REG</sub> e plasmablastos.

Como pode ser observado na Figura 25, os valores relativos de linfócitos B imaturos não foram diferentes entre os grupos, porém o percentual de linfócitos B maduros foi menor no grupo exposto ( $p < 0,01$ ) em comparação ao grupo controle. Os valores absolutos de linfócitos B imaturos, em células/ $\mu$ l de SP, não foram diferentes entre os grupos avaliados, assim como os linfócitos B maduros.

**Figura 26.** Valores relativos e absolutos de linfócitos B imaturos e maduros.



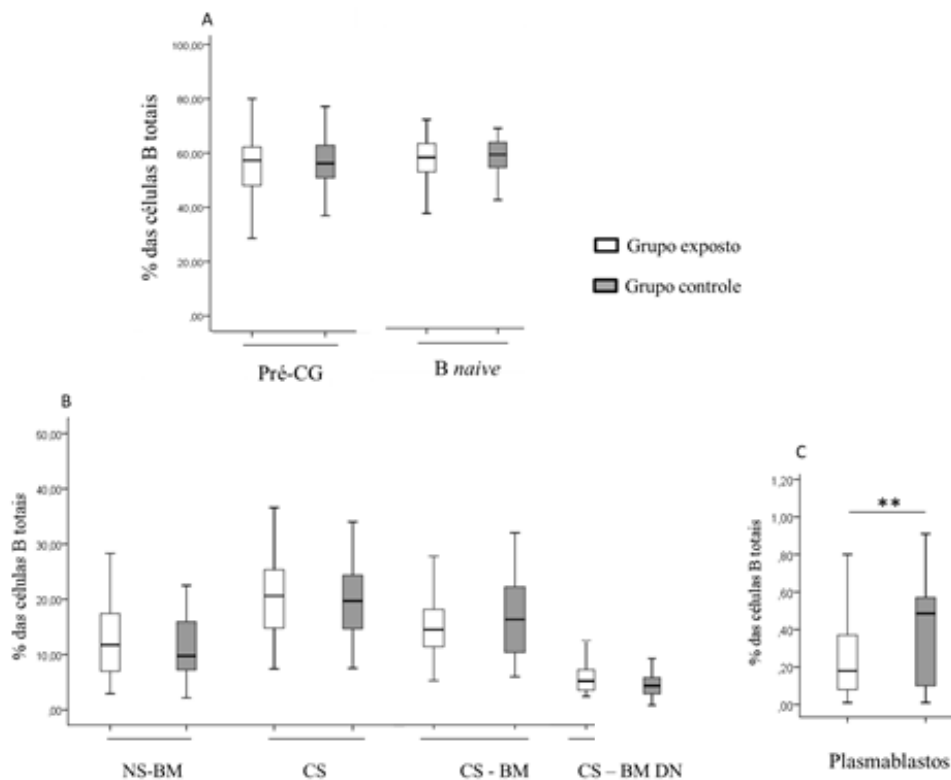
As linhas horizontais internas em cada grupo representam as medianas; *boxes* e *whiskers* representam, respectivamente, os interquartis e valores mínimos e máximos. No Painel B: \*\*  $p < 0,01$  (*Mann-Whitney test*). Grupo exposto (N = 40); grupo controle (N = 30). Fonte: autora.

As células B também tiveram suas proporções quanto ao estágio maturativo avaliadas. Os valores relativos das células B do compartimento pré-CG (B transicionais somadas às B *naïve*), B *naïve*, B *non-switched* de memória (NS-BM), B *class-switched* totais (CS), B *class-switched* de memória (CS-BM), B *class-switched* de memória duplamente negativas (CS-BM DN) e os plasmablastos estão ilustrados na Figura 26. De um modo geral, as proporções

foram mantidas, exceto os plasmablastos, que aparecem em menores proporções no grupo exposto ( $p < 0,01$ ).

Por outro lado, ao considerarmos as quantidades absolutas dessas células por  $\mu\text{l}$  de SP, obtivemos resultados distintos entre os grupos, com valores diminuídos no grupo exposto em muitas subpopulações, assim como nas células B totais. Os resultados estão demonstrados na Tabela 14.

**Figura 27.** Avaliação das células B quanto ao estágio maturativo.



Painel A: comparação dos subtipos de células B em: compartimento pré-CG (pré-naïve somadas às B naïve) e células B naïve (BN). Painel B: comparação dos subtipos de células B em *non-switched* B de memória (NS-BM), *class-switched* (CS) totais, CS-BM ( $\text{CD}27^+$ ) e CS-BM DN ( $\text{CD}27^{\text{neg}}$ ) (duplo negativas). As linhas horizontais internas em cada grupo representam as medianas; *boxes* e *whiskers* representam, respectivamente, os interquartis e valores mínimos e máximos. Painel C: valores relativos de plasmablastos. CG: centro germinativo. Neg: ausência de expressão. No Painel B:  $*p < 0,05$  e no Painel C:  $**p < 0,01$  (*Mann-Whitney test*). Grupo exposto (N = 40); grupo controle (N = 30). Fonte: autora.

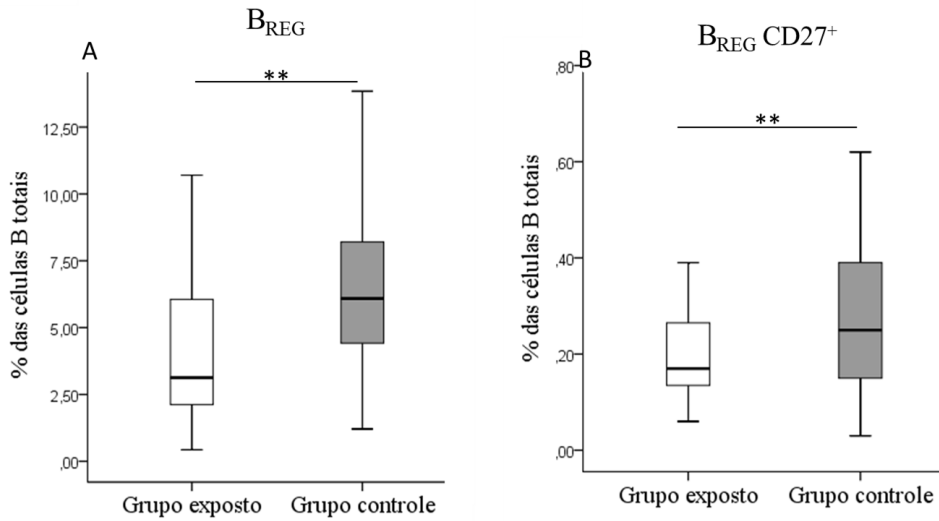
**Tabela 15.** Valores absolutos das células B e das subpopulações em diferentes estágios maturativos.

Células/ $\mu$ l	Grupo exposto		Grupo controle		<i>p</i> value
<b>Células B totais</b>	<b>191,19</b>	<b>(39,19–507,74)</b>	<b>261,19</b>	<b>(91,49–739,45)</b>	<b>0,01*</b>
<b>B imaturas</b>	0,36	(0,00 – 3,22)	0,38	(0,00 – 4,61)	0,81
<b>B maduras</b>	166,52	(39,02 – 506,06)	225,73	(81,74 – 481,18)	0,06
<b>B transicionais</b>	<b>6,08</b>	<b>(0,80 – 68,36)</b>	<b>11,49</b>	<b>(2,87 – 90,65)</b>	<b>0,01*</b>
<b>B naïve</b>	<b>87,31</b>	<b>(7,05 – 310,84)</b>	<b>144,99</b>	<b>(24,83 – 401,52)</b>	<b>0,03*</b>
<b>NS-BM</b>	20,04	(3,12 – 112,86)	26,05	(2,80 – 132,23)	0,05
<b>CS</b>	34,08	(12,42 – 137,29)	50,41	(10,64 – 167,50)	0,05
<b>CS-BM</b>	<b>24,17</b>	<b>(9,54 – 105,17)</b>	<b>39,25</b>	<b>(9,10 - 139,61)</b>	<b>0,02*</b>
<b>CS-BM DN</b>	9,13	(2,42 - 63,67)	10,72	(1,54 – 29,51)	0,82
<b>Plasmablastos</b>	<b>0,31</b>	<b>(0,01 – 1,76)</b>	<b>0,99</b>	<b>(0,03 – 4,01)</b>	<b>0,00**</b>
<b>B<sub>REG</sub></b>	<b>6,06</b>	<b>(0,43 – 59,79)</b>	<b>14,23</b>	<b>(2,36 – 84,15)</b>	<b>0,00**</b>
<b>B<sub>REG</sub> CD27<sup>+</sup></b>	<b>0,33</b>	<b>(2,10 - 291,08)</b>	<b>0,64</b>	<b>(0,04 – 2,98)</b>	<b>0,00**</b>

Valores representados em quantidades de células por  $\mu$ l de sangue total; mediana (intervalo). NS-BM: células B *non-switched* memória; CS: células B *class-switched*; CS-BM: células B *class-switched* memória; CS-BM DN: células B *class-switched* memória duplamente negativas. \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$  (*Mann-Whitney test*). Grupo exposto (N = 40); grupo controle (N = 30). Fonte: autora.

Em relação aos linfócitos B<sub>REG</sub>, os valores relativos apresentaram-se estatisticamente diminuídos no grupo exposto ( $p < 0,01$ ) em comparação ao grupo controle. O mesmo comportamento foi observado com relação às células B<sub>REG</sub> CD27<sup>+</sup> ( $p < 0,01$ ), conforme mostra a Figura 27. Os valores absolutos dessas duas subpopulações estão demonstrados na Tabela 14 e também estão significativamente diminuídos no grupo exposto.

**Figura 28.** Proporção das células  $B_{REG}$  e  $B_{REG} CD27^+$  em relação às células B totais.

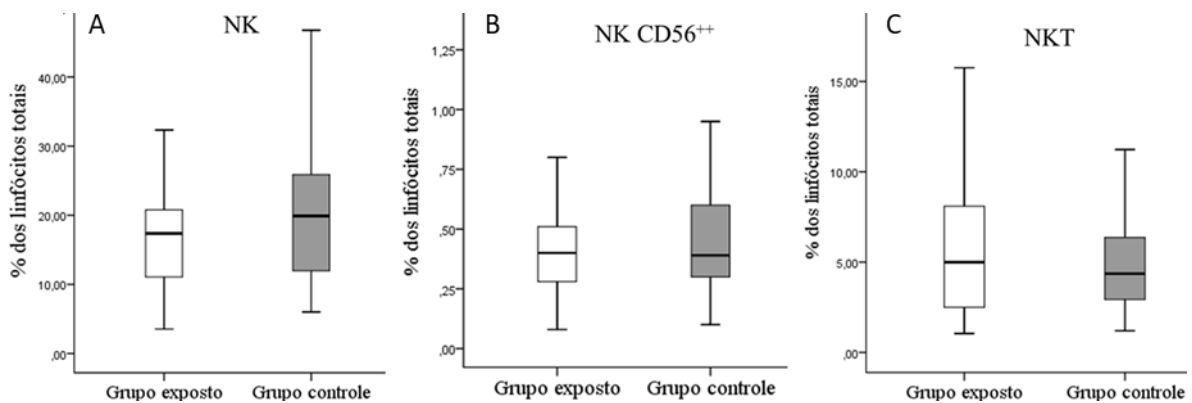


As linhas horizontais internas em cada grupo representam as medianas; *boxes* e *whiskers* representam, respectivamente, os interquartis e valores mínimos e máximos. \*\*  $p < 0,01$  (*Mann-Whitney test*). Grupo exposto (N = 40); grupo controle (N = 30). Fonte: autora.

## 5.9 NK e NKT

As células NK, NK CD56<sup>++</sup> e NKT foram avaliadas quanto a sua proporção, considerando os linfócitos totais como 100% e quanto às suas quantidades absolutas em células por  $\mu$ l de SP. Porém, não foram encontrados resultados distintos entre os grupos em nenhum desses cenários, conforme ilustram a Figura 28 e a Tabela 15, respectivamente.

**Figura 29.** Distribuição das células NK, NK CD56<sup>++</sup> e NKT em relação aos linfócitos totais.



As linhas horizontais internas em cada grupo representam as medianas; *boxes* e *whiskers* representam, respectivamente, os interquartis e valores mínimos e máximos. NK: células *natural killer*; NKT: células *natural killer* T. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos (*Mann-Whitney test*). Grupo exposto (N = 40); grupo controle (N = 30). Fonte: autora.

**Tabela 16.** Valores absolutos das células NK e subpopulação NK CD56<sup>++</sup> e das NKT.

Células/ $\mu$ l	Grupo exposto	Grupo controle	<i>p value</i>
NK	278,13 (54,22 – 936,94)	327,79 (99,70 – 775,01)	0,31
NK CD56 <sup>++</sup>	7,91 (1,77 – 19,98)	8,16 (2,73 – 29,35)	0,88
NKT	90,83 (21,30 – 358,56)	62,33 (23,32 – 420,92)	0,59

Valores representados em quantidades de células por  $\mu$ l de sangue total; mediana (intervalo). NK: células *natural killer*; NKT: células *natural killer T*. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos (*Mann-Whitney test*). Grupo exposto (N = 40); grupo controle (N = 30). Fonte: autora.

### 5.1 CITOCINAS

Neste trabalho também foram quantificadas as citocinas plasmáticas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, TNF e IFN- $\gamma$  em ambos os grupos. A IL-6 apresentou valores significativamente maiores no grupo exposto em comparação ao grupo controle. A Tabela 16 traz as informações relativas às citocinas em pg/ ml.

**Tabela 17.** Comparação das concentrações plasmáticas de citocinas entre os grupos.

Citocinas (pg/ ml)	Grupo exposto Mediana (intervalo)	Grupo controle Mediana (intervalo)	<i>p value</i>
IL-2	0,16 (0,00 – 5,25)	0,00 (0,00 – 1,07)	0,09
IL-4	0,29 (0,00 – 11,82)	0,25 (0,00 – 2,29)	0,39
IL-6	<b>0,51 (0,00 - 10,51)</b>	<b>0,35 (0,00 – 3,04)</b>	<b>0,04*</b>
IL-10	0,00 (0,00 – 9,78)	0,00 (0,00 – 0,35)	0,08
TNF	0,00 (0,00 – 18,15)	0,00 (0,00 – 0,61)	0,72
IFN- $\gamma$	0,00 (0,00 – 11,82)	0,00 (0,00 – 3,32)	0,21
IL-17 A	0,00 (0,00 – 7,09)	0,00 (0,00 – 2,60)	0,74

IL-2: Interleucina-2; IL-4: Interleucina-4; IL-6: Interleucina-6; IL-10: Interleucina-10; TNF: fator de necrose tumoral; IFN- $\gamma$ : Interferon- $\gamma$ ; IL-17A: Interleucina-17 A. (\*)  $p < 0,05$  (*Mann-Whitney test*). Grupo exposto (N = 40); grupo controle (N = 30). Fonte: autora.

## 5.2 CORRELAÇÕES ENTRE SUBPOPULAÇÕES DE CÉLULAS DO SI E AVALIAÇÕES BIOQUÍMICAS

Utilizando as correlações de *Pearson* entre as variáveis, encontrou-se moderada correlação negativa entre o número absoluto de monócitos por  $\mu\text{l}$  de SP e a atividade de BChE, ou seja, quanto mais inibida a atividade da enzima pelo uso de agrotóxicos, maior o número de monócitos circulantes. Também foi observada correlação positiva fraca entre o número absoluto de linfócitos B por  $\mu\text{l}$  de SP e a atividade de AChE, ou seja, quanto mais inibida a enzima menor o número de linfócitos B. Os resultados significativos estão destacados em negrito na Tabela 17.

**Tabela 18.** Correlações significativas entre colinesterases e células do SI.

Variáveis		AChE	BChE
<b>Monócitos</b> (células/ $\mu\text{l}$ )	<i>Pearson Correlation</i> ( $\rho$ )	,003	<b>-,436**</b>
	<i>p value</i>	,984	<b>,003</b>
<b>Linfócitos B</b> (células/ $\mu\text{l}$ )	<i>Pearson Correlation</i> ( $\rho$ )	<b>,326*</b>	,028
	<i>p value</i>	<b>,033</b>	,857

AChE: acetilcolinesterase; BChE: butirilcolinesterase. Valores em negrito representam as correlações significativas (*Pearson correlation*). Valores de  $\rho$  até 0,39 positivos ou negativos foram considerados correlação fraca; valores de 0,40 a 0,69 foram considerados correlação moderada. Fonte: autora.

Correlações positivas fortes foram encontradas entre os valores de glicemia e hemoglobina glicosilada e o número absoluto de  $T_{\text{REG}}$  total por  $\mu\text{l}$  de SP. Os valores absolutos de  $T_{\text{REG}}$  *naïve* também possuem correlação positiva forte com a hemoglobina glicosilada e correlação positiva muito forte com a glicemia, conforme mostra a Tabela 18.

**Tabela 19.** Correlações significativas entre glicemia e HbA1c e células  $T_{\text{REG}}$ .

Variáveis		Glicemia	HbA1c
<b><math>T_{\text{REG}}</math> total</b> (células/ $\mu\text{l}$ )	<i>Pearson Correlation</i> ( $\rho$ )	<b>,865**</b>	<b>,786**</b>
	<i>p value</i>	<b>,000</b>	<b>,000</b>
<b><math>T_{\text{REG}}</math> <i>naïve</i></b> (células/ $\mu\text{l}$ )	<i>Pearson Correlation</i> ( $\rho$ )	<b>,945**</b>	<b>,862**</b>
	<i>p value</i>	<b>,000</b>	<b>,000</b>

$T_{\text{REG}}$ : linfócitos T reguladores; HbA1c: hemoglobina glicosilada. Valores em negrito representam as correlações significativas (*Pearson correlation*). Valores de  $\rho$  entre 0,7 e 0,9 foram considerados uma correlação forte e valores de  $\rho$  acima de 0,9 foram considerados uma correlação muito forte. Fonte: autora.



## 6 DISCUSSÃO

No Brasil, o tema segurança no uso e no consumo de agrotóxicos tem gerado muitos debates. A antiga classificação toxicológica dos agrotóxicos adotada pela ANVISA incluía a análise de estudos de toxicidade aguda por via oral, via dérmica e inalatória, além de estudos considerando irritação dérmica e ocular. A depender da dose letal mediana ( $DL_{50}$ ) (ou seja, a quantidade de substância que leva 50% dos animais estudados à letalidade) e/ou das características das lesões na pele e nos olhos, a substância era classificada como extremamente tóxica, altamente tóxica, medianamente tóxica e pouco tóxica. Com a adoção das mudanças propostas pela Resolução de Diretoria Colegiada nº 294 em 2019 (RDC 294/19), os resultados dos estudos toxicológicos de irritação dérmica e ocular não são mais utilizados para fins de classificação toxicológica (ANVISA, 2019). Assim, produtos que anteriormente eram classificados como “extremamente tóxicos” por provocarem corrosão ou serem irritantes cutâneos ou oculares agora são classificados considerando apenas o risco de morte (FIOCRUZ, 2019). A Tabela 7 apresenta diversos exemplos de substâncias que anteriormente eram consideradas como Classe I: Extremamente tóxico e hoje são Classe 5 – Improvável de causar dano agudo.

Baseado nas informações dos questionários e, em algumas ocasiões, na visita aos efetivos locais de trabalho, constatou-se o emprego combinado de múltiplas classes de agrotóxicos pelos participantes desta pesquisa. Porém, durante as entrevistas, os agricultores foram bastante evasivos a respeito das quantidades, periodicidade de uso e duração da aplicação das substâncias. Percebeu-se a preocupação de muitos sobre como essas informações seriam de fato utilizadas (receio de que chegassem aos órgãos de fiscalização?) apesar dos esclarecimentos prestados pela equipe de pesquisadores. Por essas razões, algumas informações acerca do uso de agrotóxicos obtidas pelas entrevistas podem estar subestimadas.

Uma das classes de agrotóxicos que chama atenção neste estudo é a dos piretroides, pois foi a mais citada pelos agricultores (79,1%) (Tabela 7). Sua reclassificação ocorreu da Classe I: Extremamente tóxico para a Categoria 4 – Produto Pouco Tóxico. Para citar alguns trabalhos envolvendo essa classe de agrotóxico, temos um estudo de 2016 realizado por Tu e colaboradores em que piretroides supostamente induziram efeitos neurotóxicos, hepatotóxicos, nefrotóxicos e interferiram no sistema imunológico em mamíferos (TU et al., 2016). Em outro experimento realizado em 2017, o qual utilizou macrófagos murinos tratados

por piretroides, observou-se a diminuição da viabilidade celular e indução de apoptose pela regulação positiva da proteína 53 (p53) e da caspase 3 e regulação negativa da proteína Bcl-2 (do inglês, *B-cell lymphoma-2*). Além disso, também foi detectada a inibição da expressão do mRNA para IFN- $\beta$  após a infecção viral dos macrófagos, o que levou à perda da atividade antiviral e também inibição da transcrição de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  (WANG, X. et al., 2017). A cipermetrina, que é um piretróide disruptor endócrino, pode favorecer metástases de câncer de pulmão ao inibir o desenvolvimento de macrófagos M1 e aumentar a polarização para macrófagos M2 (HUANG, F. et al., 2018). Os carbamatos, que foram citados por 74,4% dos agricultores, foram reclassificados migrando da Classe II: Altamente tóxico para a Classe 5 – Improvável de causar dano agudo. No entanto, já se verificou que tais substâncias afetam a ação de tirosinas quinases citoplasmáticas presentes em células T e células NK. A sinalização dessas quinases e do TCR desempenha papéis importantes na regulação das células T, afetando a liberação de citocinas e a proliferação celular (PALACIOS; WEISS, 2004). Células NK tratadas com carbamatos também apresentaram imunotoxicidade associada à indução de apoptose e diminuição da expressão de perforina e granzima (LI; KOBAYASHI; KAWADA, 2015). Outro agrotóxico de destaque no presente estudo foi o glifosato, citado por 74,4% dos agricultores. O glifosato é um dos produtos herbicidas mais utilizados e, atualmente, seu uso está sob o intenso debate. Há discrepâncias entre as concentrações autorizadas nos países, o que demonstra a ausência de um consenso claro sobre o glifosato até o momento. (MADDALON et al., 2021). No Brasil, o glifosato passou da Classe III: Moderadamente tóxico, para a Categoria 4 – Produto Pouco Tóxico. Os efeitos do glifosato no sistema imunológico parecem estar relacionados à alteração da cascata do complemento, prejuízos da função fagocítica das células imunes, aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias e alteração das funções linfocitárias, o que prejudica as interações entre microrganismos e o sistema imunológico (PEILLEX; PELLETIER, 2020). Em 2017, a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC), ligada à Organização Mundial de Saúde (OMS), classificou o glifosato como “provavelmente carcinogênico” em humanos. No entanto, outras agências não endureceram suas restrições ao glifosato e até prolongaram as autorizações de seu uso.

Recentemente, no Brasil, travou-se uma discussão polêmica acerca do Projeto de Lei 6.299 de 2002 (PL 6299/02), também chamado de “Pacote do Veneno”, o qual altera a Lei de Agrotóxicos (Lei 7.802/89). Dentre algumas mudanças trazidas pelo PL 6299/02 estão a substituição da denominação “agrotóxicos” por “defensivos fitossanitários”; o enfoque de

urgência nos processos de registro de agrotóxicos; o fato de os estados perderem o poder de vetar agrotóxicos autorizados pelo governo federal; a autorização do uso de agrotóxicos quando os riscos forem considerados “aceitáveis” (incluindo carcinogenicidade, mutagenicidade, distúrbios hormonais e danos ao meio ambiente), dentre outras. O INCA lançou uma NOTA PÚBLICA ACERCA DO POSICIONAMENTO DO INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER SOBRE O PROJETO DE LEI Nº 6.299/2002, em que se manifesta contrário a ele.

(...) Dentre os efeitos sobre a saúde humana associados à exposição aos agrotóxicos, os mais preocupantes são as intoxicações crônicas, caracterizadas por infertilidade, impotência, abortos, malformações, neurotoxicidade, manifestada através de distúrbios cognitivos e comportamentais e quadros de neuropatia e desregulação hormonal. (...) Além disso, há estudos que evidenciaram os efeitos imunotóxicos, caracterizados por imunostimulação ou imunossupressão, sendo esta última fator favorável à diminuição na resistência a patógenos ou mesmo, diminuição da imunovigilância com comprometimento do combate às células neoplásicas levando a maior incidência de câncer, e efeitos genotóxicos como fatores preditores para o câncer. (...) Considerando que o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA/SAS/MS) tem como missão promover o controle do câncer com ações nacionais integradas em prevenção, assistência, ensino e pesquisa e considerando o aumento dos problemas de Saúde Pública, que serão gerados com a flexibilização do processo de registro dos agrotóxicos no Brasil, o INCA se manifesta contrário ao PL 6.299/2002 (INCA, 2018).

O primeiro estudo a chamar atenção para os possíveis efeitos dos agrotóxicos na função leucocitária humana foi realizado em 1979 por Lee, Moscati e Park. Esses pesquisadores demonstraram *in vitro* que a proliferação de leucócitos em fito-hemaglutinina (um agente pró-mitótico) havia diminuído na presença de agrotóxicos OF (LEE, T. P.; MOSCATI; PARK, 1979). Posteriormente, Hermanowicz e Kossman (1984) mostraram um prejuízo acentuado na quimiotaxia e na adesão de neutrófilos de trabalhadores expostos aos agrotóxicos (HERMANOWICZ; KOSSMAN, 1984). No presente estudo, o grupo exposto ocupacionalmente a agrotóxicos apresentou maior número absoluto de neutrófilos imaturos circulantes (Figura 18). Esse dado sugere uma alta demanda por neutrófilos à medula óssea, havendo, inclusive, escape de células ainda imaturas para o SP (CHERIAN et al., 2010). Esse recrutamento excessivo de neutrófilos pode indicar que estejam, possivelmente, ocorrendo

falhas na função dos neutrófilos do SP, o que os torna insuficientes no combate a infecções e nos processos inflamatórios em geral. No estudo de Queiroz e colaboradores (1999), a fagocitose e a morte intracelular de *Candida albicans* e *Candida pseudotropicalis* por neutrófilos no SP de agricultores foram estudadas. As duas espécies de *Candida* foram utilizadas, uma vez que em indivíduos com deficiência de mieloperoxidase os neutrófilos são incapazes de matar *Candida albicans*, enquanto *Candida pseudotropicalis* pode ser efetivamente lisada. A fagocitose de ambos os antígenos foi normal pelos neutrófilos de todos os agricultores estudados. No entanto, houve uma redução considerável da capacidade dos neutrófilos nos trabalhadores expostos de matar *Candida albicans*, enquanto a *Candida pseudotropicalis* foi efetivamente lisada. Esse achado indica alguma interferência com a atividade da mieloperoxidase dos neutrófilos da população exposta a agrotóxicos (QUEIROZ; FERNANDES; VALADARES, 1999).

Outros resultados que chamam atenção no presente estudo são o aumento absoluto e relativo de monócitos clássicos (Tabela 9 e Figura 20, respectivamente) e o aumento absoluto de mDCs (Figura 21) no SP dos agricultores. A absorção através da pele é a principal via de exposição a agrotóxicos nos indivíduos que aplicam essas substâncias (SO et al., 2014). Na pele, são encontrados macrófagos (células provenientes de monócitos) e DCs predominantemente derivadas de monócitos (neste estudo denominadas mDCs) que desempenham um papel como APCs dando início à resposta imune. Após o contato com um antígeno, as APCs são ativadas e migram através dos vasos linfáticos para os órgãos linfoides secundários, onde interagem com os linfócitos T (MORANDI et al., 2014). Os valores aumentados dessas células no SP indicam alta demanda pelo SI. Wafa e colaboradores (2013) encontraram resultados semelhantes para monócitos em seu estudo com agricultores tunisianos (WAFA et al., 2013). No entanto, o aumento quantitativo não garante plena funcionalidade dessas células. O comprometimento funcional de DCs e de macrófagos após a exposição a agrotóxicos já foi claramente demonstrado por alguns estudos *in vitro* (SCHÄFER et al., 2013; XIA et al., 2014; HUANG, FANG et al., 2016). Outro fato importante é que as APCs também são essenciais para a resposta imune inicial nos pulmões, que são amplamente atingidos pela inalação que pode ocorrer durante a aplicação dos agrotóxicos, e a funcionalidade comprometida dessas células pode estar relacionada à lesão pulmonar que, não raro, é associada à exposição aos agrotóxicos em diversos estudos. Tosse crônica, sibilância, dispneia, “aperto no peito”, asma e bronquite crônica são os sintomas e doenças mais citados pelos estudos envolvendo doenças pulmonares e exposição a

agrotóxicos (BEARD et al., 2003; HOPPIN et al., 2006; SALAMEH et al., 2006; NDLOVU; DALVIE; JEEBHAY, 2014; MAMANE et al., 2015).

As DCs ou APCs, como já mencionado, desempenham um papel fundamental na iniciação de respostas imunes, apresentando antígenos para os linfócitos T (MERAD et al., 2013; TKACH et al., 2017). Os linfócitos T *naïve* circulam continuamente pelo corpo, migrando pelo sangue e pelos órgãos linfoides secundários. Ao interagirem com as APCs nesses órgãos, os linfócitos T *naïve* são ativados e sofrem várias alterações moleculares, como por exemplo, a perda de CD45 RA (SAMJI; KHANNA, 2017). Neste estudo, foi observado o aumento de linfócitos T CD8<sup>+</sup> com a perda do CD45 RA (ou seja, ativados pelas APCs), tanto do tipo T CD8<sup>+</sup> CM, quanto de T CD8<sup>+</sup> EM. Em contrapartida, os linfócitos T CD8<sup>+</sup> EM RA encontraram-se diminuídos no grupo exposto (Tabela 10). Esses achados são concordantes com estudos *in vitro*, os quais mostraram que a apresentação de antígenos aos linfócitos T CD8<sup>+</sup> ou CTLs, bem como sua proliferação, não parece ser prejudicada por agrotóxicos (SHEIL et al., 2006), porém, a atividade citotóxica pode ser prejudicada por esses compostos (LI et al., 2002; SHEIL et al., 2006; LEE, G. H.; CHOI, 2020). De fato, as células T CD8<sup>+</sup> CM possuem alta capacidade de proliferação, originando as T CD8<sup>+</sup> EM, no entanto as células T CD8<sup>+</sup> EM RA (diminuídas nos agricultores) são dotadas de alta capacidade citotóxica e respondem prontamente à reexposição a antígenos (mais rapidamente que as T CD8<sup>+</sup> CM) (SALLUSTO et al., 2000; AHLERS; BELYAKOV, 2010; GEGINAT et al., 2013). Portanto, a ação citotóxica pode estar comprometida no grupo dos agricultores, já que os CTLs com maior capacidade citotóxica estão significativamente diminuídos. De modo geral, os CTLs contribuem para o controle de infecções virais (especialmente na ausência de anticorpos) (GRANT et al., 2016) e são as células imunes mais importantes no combate ao câncer (FARHOOD; NAJAFI; MORTEZAEE, 2019). Portanto, qualquer prejuízo na ação dessas células pode impedir ou dificultar a luta contra proliferações neoplásicas ou infecções virais, e essas são duas condições associadas à exposição aos agrotóxicos em diversos estudos (LERRO et al., 2021).

Devido ao baixo peso molecular (< 1000 D), muitos agrotóxicos são classificados como haptenos, ou seja, sozinhos eles são incapazes de evocar uma forte resposta imune. No entanto, esses produtos químicos se ligam a grandes proteínas próprias (como as proteínas séricas) por ligação covalente, gerando um padrão antigênico e, assim, podem fomentar respostas alérgicas, de reações cruzadas e até mesmo autoimunes. A resposta imune a esse

complexo hapteno-proteína carreadora requer, além das APCs, a existência de células B específicas para o hapteno e, simultaneamente, células Th específicas para a proteína. Essas células B específicas ligam-se ao determinante do hapteno e internalizam o conjugado. As células B por sua vez expressam moléculas de MHC classe II e apresentam peptídeos derivados da proteína carreadora a linfócitos Th específicos para essa proteína. Assim, os dois tipos de linfócitos cooperam reconhecendo diferentes epítopos do mesmo complexo antigênico. (MOKARIZADEH et al., 2015). Neste estudo, os agricultores apresentaram diminuição absoluta e relativa de linfócitos B totais (Figuras 16 e 17, respectivamente), do percentual dos linfócitos B maduros em relação aos linfócitos totais (Figura 25) e do percentual de plasmablastos em relação aos linfócitos B totais (Figura 26). A diminuição do número de células B no SP sugere que esses indivíduos estão, possivelmente, sofrendo imunossupressão, pois provavelmente a produção de anticorpos está diminuída e, portanto, a função imunológica está enfraquecida. O estímulo constante da resposta ao efeito hapteno-carreador pode causar imunotoxicidade direta aos órgãos linfoides secundários, com consequente ineficiência da resposta humoral. De acordo com Mokarizadeh e colaboradores (2015), os órgãos linfoides secundários podem ser diretamente prejudicados por agrotóxicos ou seus produtos de biotransformação e suas células imunes derivadas podem ter a sinalização de sobrevivência afetada durante o seu desenvolvimento e expansão (MOKARIZADEH et al., 2015). Portanto, a diminuição das células B no SP possivelmente ocorre em consequência do aumento da sua vida útil nos centros germinativos dos folículos linfoides (COSTA, C. et al., 2014), pois, nesse microambiente, as células B podem tornar-se resistentes à indução de apoptose devido aos sinais de sobrevivência gerados pela ligação às DCs que também se encontram ali (BLOOM; LEMLEY; MUSCARELLA, 2006). Esses resultados corroboram aqueles observados por Aroonvilairat e colaboradores (2015) e por Costa e colaboradores (2014) que observaram diminuição de células B no SP de agricultores (COSTA, C. et al., 2014; AROONVILAIRAT et al., 2015).

Uma subpopulação de células B importante que também está diminuída no grupo exposto é a de células B<sub>REG</sub> (Tabela 14 e Figura 27). Tais células são amplamente aceitas como um componente modulador do sistema imunológico que suprime a inflamação. As populações de células B<sub>REG</sub> são pequenas em condições fisiológicas, mas se expandem substancialmente tanto em pacientes humanos quanto em modelos murinos de doenças inflamatórias crônicas, doenças autoimunes, infecções, transplantes e câncer (WANG, L.; FU; CHU, 2020). A formação de células B<sub>REG</sub> não é restrita a um determinado estágio de

maturação das células B. Considerando publicações recentes, foi demonstrado que células B imaturas, células B maduras e até mesmo os plasmablastos (os quais também se encontram em menor número no grupo exposto) tem a capacidade de se diferenciar em células B<sub>REG</sub>. Esses estudos reforçam a ideia de que o principal requisito para a diferenciação de células B<sub>REG</sub> não é a expressão de um fator de transcrição específico de células B<sub>REG</sub>, mas sim o ambiente no qual uma célula B se encontra e, nesse sentido, as citocinas pró-inflamatórias podem conduzir a indução de células B<sub>REG</sub> (ROSSER; MAURI, 2015). Dois fenótipos distintos de células B<sub>REG</sub> encontraram-se diminuídos no grupo exposto deste estudo, o que é extremamente preocupante devido ao papel imunorregulador que essas células desempenham. O primeiro é proveniente de células B imaturas expressando CD19<sup>+</sup> CD24<sup>hi</sup> CD38<sup>hi</sup>, que podem ser encontrados no SP e nos locais de inflamação. Sua ação imunorregulatória ocorre pela produção de IL-10, supressão de células T CD4<sup>+</sup> e das respostas de células T CD8<sup>+</sup> específicas para vírus, além da indução de células T<sub>REG</sub>. Esse fenótipo de B<sub>REG</sub> é defeituoso em pacientes com doenças autoimunes como LES e Artrite Reumatoide (AR) (BLAIR et al., 2010; FLORES-BORJA et al., 2013; ROSSER; MAURI, 2015). O outro fenótipo é proveniente de plasmablastos que expressa CD27. Esse subtipo de célula B<sub>REG</sub> pode ser encontrado no SP e, além de produzir IL-10 e suprimir as células T CD4<sup>+</sup>, ele também suprime a ação das DCs (MATSUMOTO et al., 2014).

Quanto às células NK, neste estudo não foram encontradas diferenças quantitativas relativas ou absolutas entre os grupos avaliados (Figura 28 e Tabela 15, respectivamente). De fato, os estudos não demonstram prejuízo na proliferação destas células quando expostas a agrotóxicos. No entanto, diversos estudos demonstram haver transtornos na parte funcional das células NK, como prejuízo da lise de células-alvo, diminuição das concentrações de ATP e menor liberação de granzimas e perforinas, além da inibição da capacidade de ligação dessas células (TAYLOR; TUCKER; WHALEN, 2005; ROWE; BRUNDAGE; BARNETT, 2007; NNODU; WHALEN, 2008; TAYLOR; WHALEN, 2009; LI; KOBAYASHI; KAWADA, 2015).

Outro resultado relevante do presente estudo foi o aumento da concentração de IL-6 plasmática no grupo exposto (Tabela 16). Essa citocina é secretada por células T, monócitos, células endoteliais e fibroblastos (SCHAPER; ROSE-JOHN, 2015). A IL-6 atua na ativação e na quimiotaxia de neutrófilos e monócitos para regiões teciduais inflamadas. Enquanto os neutrófilos atuam nos eventos iniciais da inflamação, os estados posteriores são dominados

por monócitos e, nessa “troca” de leucócitos, a IL-6 desempenha um papel fundamental (HURST et al., 2001). Além da IL-6 plasmática, este estudo observou, conforme citado anteriormente, valores aumentados de neutrófilos imaturos e monócitos circulantes no SP dos agricultores. Em conjunto, esses resultados sugerem que esses agricultores expostos a agrotóxicos encontram-se em condições pró-inflamatórias. Atualmente, semelhante à PCR, a IL-6 é dosada para monitorar a inflamação em pacientes com câncer, infecção ou doenças autoimunes. O motivo do uso da IL-6 como biomarcador é seu papel central na ativação e manutenção da resposta inflamatória (HURST et al., 2001; LUNA et al., 2014).

No entanto, a IL-6 não atua somente na fase aguda da inflamação. Os avanços recentes têm demonstrado que essa citocina atua na transição entre as respostas imunes inatas e adquiridas (MCLOUGHLIN et al., 2005). Curiosamente, a IL-6 foi descrita inicialmente por seus efeitos na imunidade adaptativa como promotora da diferenciação das células T em T CD4<sup>+</sup> (DIEHL; RINCÓN, 2002). Contudo, neste estudo não houve diferenciação dessa população entre os grupos. A primeira referência à IL-6 foi como um fator estimulador de células B pelo grupo de Kishimoto, em 1986 (HIRANO et al., 1986) e, em 1988, o mesmo grupo publicou um estudo demonstrando que a IL-6 atua também na diferenciação de CTL *in vitro* (OKADA et al., 1988).

Exposições, tanto crônicas quanto agudas, a agrotóxicos podem ser avaliadas pela atividade de duas enzimas colinesterases. A AChE ou “colinesterase verdadeira” localiza-se nos eritrócitos e em terminais nervosos colinérgicos, enquanto a BChE ou “pseudocolinesterase” está presente no plasma, fígado, músculo liso e adipócitos. Está bem estabelecido que a AChE é um biomarcador de efeito dos OF e CBM e há evidências de que a inibição da AChE se correlaciona com sintomas induzidos pela toxicidade dos agrotóxicos (SIMONIELLO et al., 2010). A AChE é, de fato, um biomarcador mais preciso das exposições crônicas e de baixa intensidade. Por outro lado, a BChE se reduz de forma mais rápida e intensa do que a AChE, refletindo a exposição aguda aos agrotóxicos. O tempo de meia-vida da BChE é de 8 dias e a sua recuperação inicia-se em 72 horas após a exposição, por isso, tem pouco valor na identificação das intoxicações crônicas. Já a AChE pode perdurar por até 100 a 120 dias, que é o tempo de vida estimado dos eritrócitos (MARONI et al., 2000; ATSDR, 2014).

O monitoramento dessas enzimas em indivíduos com exposição ocupacional a agrotóxicos deve ser realizado e, sempre que possível, é interessante determinar os valores basais para cada indivíduo, visto que a variabilidade individual desses parâmetros é muito alta



(ATSDR, 2014). Neste estudo, tanto a atividade de AChE quanto de BChE mantiveram-se dentro dos valores de referência (Tabela 6). Porém, esses dados não eliminam a possibilidade de que os agricultores estejam sofrendo efeitos deletérios. Queiroz e colaboradores (1999) encontraram disfunções nos neutrófilos de trabalhadores que apresentavam atividade das colinesterases dentro dos valores de referência (QUEIROZ; FERNANDES; VALADARES, 1999). Da mesma forma, Aiassa e colaboradores (2019) encontraram danos ao DNA de trabalhadores rurais sem alterações na atividade das colinesterases plasmáticas (AIASSA et al., 2019). Além disso, apesar de estarem dentro dos valores de referência, neste estudo encontramos uma correlação positiva fraca entre a atividade de AChE e a quantidade de células B totais (Tabela 17), mostrando que quanto menor a atividade da enzima (ou seja, maior inibição causada pela ação de agrotóxicos), menos células B foram encontradas no SP dos agricultores. No caso da BChE, foi encontrada correlação negativa fraca com a quantidade de monócitos totais, ou seja, quanto menor a atividade da enzima (maior inibição), maior a quantidade de monócitos no SP. Esses resultados corroboram a hipótese de que tais alterações quantitativas de células tenham como causa a exposição ocupacional aos agrotóxicos.

Chama atenção neste estudo o percentual de agricultores que apresentaram elevação da glicemia de jejum e HbA1c (Tabela 6). O diagnóstico de diabetes não pode ser determinado baseando-se em uma única medição desses parâmetros, no entanto percebe-se uma tendência à hiperglicemia na população estudada. Essa condição intermediária caracterizada por concentrações glicêmicas elevadas apresenta um risco aumentado para *diabetes mellitus* e suas complicações, incluindo as doenças cardiovasculares. Segundo a Pesquisa Nacional de Saúde de 2014-2015, a prevalência de hiperglicemia intermediária e pré-diabetes era de 18,5% (17,4 - 19,7) no Brasil e 16,7% (14,4 - 19,3) especificamente na região Sul (ISER et al., 2021). Porém, no presente estudo, a prevalência de hiperglicemia na população estudada foi de 52,5%. Um estudo de coorte de Montgomery e colaboradores (2008) que acompanhou aplicadores de agrotóxicos por 10 anos concluiu que existia um risco aumentado de diabetes independente de idade, estado de residência e índice de massa corporal, especialmente quando aplicados OF e organoclorados (estes últimos tiveram a comercialização proibida no Brasil em 2007) (MONTGOMERY et al., 2008). Outro estudo transversal com uma população rural coreana exposta a agrotóxicos sugeriu uma associação com diabetes, que foi mais forte em indivíduos apresentando sobrepeso (PARK et al., 2019).

Por fim, foram encontradas correlações positivas forte e muito forte entre os linfócitos T<sub>REG</sub> e os resultados de glicemia de jejum e HbA1c, respectivamente (Tabela 18). As células T<sub>REG</sub> são essenciais na manutenção da tolerância imunológica, pois pelo seu papel supressor colaboram com a homeostase e equilíbrio imunes. Sendo assim, as complicações decorrentes de respostas imunes anormais são as principais causas de mortalidade e morbidade em pacientes diabéticos (ZHEN et al., 2012). Na literatura, já existem estudos com modelos animais abordando essa correlação. Um estudo de Zhen e colaboradores (2012) utilizou camundongos diabéticos induzidos por estreptozotocina (STZ) para estudar os efeitos da hiperglicemia de longo prazo na produção e função de linfócitos T<sub>REG</sub> *in vivo*. Quatro meses após a indução, a frequência de células T<sub>REG</sub> foi significativamente elevada no SP e tecidos linfoides dos animais. Além disso, essas células apresentaram prejuízos das funções imunossupressoras que foram resgatados após a administração de insulina (ZHEN et al., 2012). Outro estudo de Muller e colaboradores (2011) utilizando o mesmo modelo animal encontrou um aumento relativo de linfócitos T<sub>REG</sub> no SP, porém questiona se este resultado seria um efeito direto da STZ ou um efeito indireto da hiperglicemia (MULLER et al., 2011). Os mecanismos pelos quais haveria elevação das células T<sub>REG</sub> em função da hiperglicemia não foram elucidados até o momento.

## 7 CONCLUSÕES

Em comparação ao grupo controle, os agricultores com exposição ocupacional a múltiplos agrotóxicos apresentaram no SP:

- Aumento de valores relativos e absolutos de neutrófilos imaturos;
- Aumento de valores relativos e absolutos de monócitos clássicos;
- Aumento de valores absolutos de mDCs;
- Aumento de valores absolutos de linfócitos T CD8<sup>+</sup> CM e T CD8<sup>+</sup> EM e diminuição dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> EM RA;
- Diminuição de valores absolutos de células B em diversos estágios maturativos;
- Aumento das concentrações de IL-6 plasmática.

Neste estudo, também foi observada correlação positiva entre a atividade da AChE e os números absolutos de células B totais e correlação negativa entre a atividade da BChE e a quantidade de monócitos totais, corroborando a hipótese de que as alterações quantitativas de células tenham como causa a exposição ocupacional aos agrotóxicos.

Além disso, ainda foram observadas correlações positivas entre os linfócitos T<sub>REG</sub> e os marcadores de hiperglicemia (HbA1c e glicemia de jejum).

Finalmente, os resultados apresentados no presente estudo sugerem que os agricultores avaliados estão mais sujeitos a desenvolver problemas de saúde em função das alterações nas quantidades das células imunes avaliadas. Estudos epidemiológicos com acompanhamento de longo prazo e grande número de participantes devem ser realizados e, preferencialmente, acompanhados por estudos *in vitro* para confirmar evidências sobre indução de imunotoxicidade por exposição a agrotóxicos. Percebe-se que na maioria dos estudos sobre o tema, células e/ou animais são expostos a um único agrotóxico, enquanto em condições da vida real os trabalhadores rurais são expostos a múltiplos produtos, a depender do tipo de cultivo e da sazonalidade. Nesses casos, prováveis sinergias ou efeitos antagônicos dessas substâncias quando elas são combinadas podem levar a efeitos e riscos singulares.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; TROTTA, E.; R. SIMEONOV, D.; MARSON, A.; BLUESTONE, J. A. Revisiting IL-2: Biology and therapeutic prospects. **Sci. Immunol**, v. 3, n. 25, p. eaat1482, 2018.
- ABDOLLAHI, M.; RANJBAR, A.; SHADNIA, S.; NIKFAR, S.; REZAIE, A. Pesticides and oxidative stress: a review. **Med Sci Monit**, v. 10, n. 6, p. Ra141-147, 2004.
- AGUILAR-GARDUNO, C.; LACASANA, M.; BLANCO-MUNOZ, J.; RODRIGUEZ-BARRANCO, M.; HERNANDEZ, A. F.; BASSOL, S.; GONZALEZ-ALZAGA, B.; CEBRIAN, M. E. Changes in male hormone profile after occupational organophosphate exposure. A longitudinal study. **Toxicology**, v. 307, n., p. 55-65, 2013.
- AHLERS, J. D.; BELYAKOV, I. M. Memories that last forever: strategies for optimizing vaccine T-cell memory. **Blood**, v. 115, n. 9, p. 1678-1689, 2010.
- AIASSA, D. E.; MAÑAS, F. J.; GENTILE, N. E.; BOSCH, B.; SALINERO, M. C.; GORLA, N. B. M. Evaluation of genetic damage in pesticides applicators from the province of Córdoba, Argentina. **Environ Sci Pollut Res Int**, v. 26, n. 20, p. 20981-20988, 2019.
- ALAVANJA, M.; HOFMANN, J.; LYNCH, C.; HINES, C. J.; BARRY, K.; BARKER, J.; BUCKMAN, D.; THOMAS, K.; SANDLER, D.; HOPPIN, J.; KOUTROS, S.; ANDREOTTI, G.; LUBIN, J.; BLAIR, A.; FREEMAN, L. Non-Hodgkin Lymphoma Risk and Insecticide, Fungicide and Fumigant se in the Agricultural Health Study. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, p., 2014.
- ALEGRE, M. L.; FRAUWIRTH, K. A.; THOMPSON, C. B. T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. **Nat Rev Immunol**, v. 1, n. 3, p. 220-228, 2001.
- ALLEN, C. D. C.; OKADA, T.; CYSTER, J. G. Germinal-Center Organization and Cellular Dynamics. **Immunity**, v. 27, n. 2, p. 190-202, 2007.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2019. **Resolução Da Diretoria Colegiada - RDC N° 296, de 29 de julho de 2019**. Disponível em: <[http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2858730/%281%29RDC\\_296\\_2019\\_COMP.pdf/3264ce69-979f-426d-b1da-b6d49f44fdcc](http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2858730/%281%29RDC_296_2019_COMP.pdf/3264ce69-979f-426d-b1da-b6d49f44fdcc)>. Acesso em: 03 set. 2020.
- AROONVILAIRAT, S.; KESPICHAYAWATTANA, W.; SORNPRACHUM, T.; CHAISURIYA, P.; SIWADUNE, T.; RATANABANANGKON, K. Effect of pesticide exposure on immunological, hematological and biochemical parameters in thai orchid farmers— A cross- sectional study. **Int. J. Environ. Res.**, v. 12, n. 6, p. 5846-5861, 2015.
- ATSDR. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. **Toxicological profile for parathion**, USA, 2014. Disponível em: <<https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp205.pdf>>. Acesso em: 01 mar. 2020.
- BANKS, C. N.; LEIN, P. J. A review of experimental evidence linking neurotoxic organophosphorus compounds and inflammation. **Neurotoxicology**, v. 33, n. 3, p. 575-584, 2012.

BARRON, L.; DOOMS, H.; HOYER, K. K.; KUSWANTO, W.; HOFMANN, J.; O'GORMAN, W. E.; ABBAS, A. K. Cutting Edge: Mechanisms of IL-2-Dependent Maintenance of Functional Regulatory T Cells. **J Immunol**, v. 185, n. 11, p. 6426-6430, 2010.

BEARD, J.; SLADDEN, T.; MORGAN, G.; BERRY, G.; BROOKS, L.; MCMICHAEL, A. Health impacts of pesticide exposure in a cohort of outdoor workers. **Environ Health Perspect**, v. 111, n. 5, p. 724-730, 2003.

BEDKE, T.; MUSCATE, F.; SOUKOU, S.; GAGLIANI, N.; HUBER, S. Title: IL-10-producing T cells and their dual functions. **Semin Immunol**, v. 44, n., p. 101335, 2019.

BERKOWSKA, M. A.; DRIESSEN, G. J.; BIKOS, V.; GROSSERICHTER-WAGENER, C.; STAMATOPOULOS, K.; CERUTTI, A.; HE, B.; BIERMANN, K.; LANGE, J. F.; VAN DER BURG, M.; VAN DONGEN, J. J.; VAN ZELM, M. C. Human memory B cells originate from three distinct germinal center-dependent and -independent maturation pathways. **Blood**, v. 118, n. 8, p. 2150-2158, 2011.

BERNARD, A.; LAMY AND, L.; ALBERTI, I. The two-signal model of T-cell activation after 30 years. **Transplantation**, v. 73, n. 1 Suppl, p. S31-35, 2002.

BÉZIAT, V.; DUFFY, D.; QUOC, S. N.; LE GARFF-TAVERNIER, M.; DECOCQ, J.; COMBADIÈRE, B.; DEBRÉ, P.; VIEILLARD, V. CD56brightCD16+ NK cells: a functional intermediate stage of NK cell differentiation. **J Immunol.**, v. 186, n. 12, p. 6753, 2011.

BLAIR, P. A.; NOREÑA, L. Y.; FLORES-BORJA, F.; RAWLINGS, D. J.; ISENBERG, D. A.; EHRENSTEIN, M. R.; MAURI, C. CD19(+)/CD24(hi)/CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients. **Immunity**, v. 32, n. 1, p. 129-140, 2010.

BLOOM, S. E.; LEMLEY, A. T.; MUSCARELLA, D. E. Potentiation of apoptosis by heat stress plus pesticide exposure in stress resistant human B-lymphoma cells and its attenuation through interaction with follicular dendritic cells: role for c-Jun N-terminal kinase signaling. **Toxicol Sci**, v. 89, n. 1, p. 214-223, 2006.

BORISH, L. C.; STEINKE, J. W. 2. Cytokines and chemokines. **J Allergy Clin Immunol**, v. 111, n. 2 Suppl, p. S460-475, 2003.

BRASIL. **Decreto N° 4.074, de 4 de janeiro de 2002**. Regulamenta a Lei N° 7.802, de 11 de julho de 1989. Disponível em:  
<[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/decreto/2002/D4074.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2002/D4074.htm). > Acesso em: 09 nov. 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. **Diretrizes para atenção integral à saúde do trabalhador de complexidade diferenciada: protocolo de atenção à saúde dos trabalhadores expostos a agrotóxicos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância em Saúde Ambiental e Saúde do Trabalhador. **Agrotóxicos na ótica do Sistema Único de Saúde**. Brasília: Ministério da Saúde, 2016.

BROWN, I. Pesticides and other agrochemicals. In : BAXTER , P. J. et al. (e d.). **Hunter's diseases es of occupations**. 10th ed. Boca Raton: CRC, 2010. Chapter 43, p. 395-456, 2010.

BUSCHINELLI, J. T. P. **Toxicologia ocupacional** – São Paulo: . Fundacentro, v. 622 f.: il, 2020.

CARDOSO, C. C.; SANTOS-SILVA, M. C. Eight-color panel for immune phenotype monitoring by flow cytometry. **J. Immunol. Methods**, v. 468, n., p. 40-48, 2019.

CASTAGNA, A.; POLATI, R.; BOSSI, A. M.; GIRELLI, D. Monocyte/macrophage proteomics: recent findings and biomedical applications. **Expert Rev Proteomics**, v. 9, n. 2, p. 201-215, 2012.

CHAMBERS, J. E.; OPPENHEIMER, S. F. Organophosphates, Serine Esterase Inhibition, and Modeling of Organophosphate Toxicity. **Toxicol. Sci.**, v. 77, n. 2, p. 185-187, 2004.

CHARO, I. F.; RANSOHOFF, R. M. The Many Roles of Chemokines and Chemokine Receptors in Inflammation. **N Engl J Med**, v. 354, n. 6, p. 610-621, 2006.

CHENG, M. H.; ANDERSON, M. S. Monogenic autoimmunity. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 30, n., p. 393-427, 2012.

CHERIAN, S.; LEVIN, G.; LO, W. Y.; MAUCK, M.; KUHN, D.; LEE, C.; WOOD, B. L. Evaluation of an 8-color flow cytometric reference method for white blood cell differential enumeration. **Cytometry B Clin Cytom**, v. 78, n. 5, p. 319-328, 2010.

CHOU, A. P.; LI, S.; FITZMAURICE, A. G.; BRONSTEIN, J. M. Mechanisms of rotenone-induced proteasome inhibition. **Neurotoxicology**, v. 31, n. 4, p. 367-372, 2010.

CHUSID, M. J. Eosinophils: Friends or Foes? **J Allergy Clin Immunol Pract**. Sep-Oct;6(5):1439-1444, 2018.

COLLIN, M.; BIGLEY, V. Human dendritic cell subsets: an update. **Immunology**, v. 154, n. 1, p. 3-20, 2018.

CORSINI, E.; SOKOOTI, M.; GALLI, C. L.; MORETTO, A.; COLOSIO, C. Pesticide induced immunotoxicity in humans: a comprehensive review of the existing evidence. **Toxicology**, v. 307, n., p. 123-135, 2013.

COSTA, C.; GARCÍA-LESTÓN, J.; COSTA, S.; COELHO, P.; SILVA, S.; PINGARILHO, M.; VALDIGLESIAS, V.; MATTEI, F.; DALL'ARMI, V.; BONASSI, S.; LAFFON, B.; SNAWDER, J.; TEIXEIRA, J. P. Is organic farming safer to farmers' health? A comparison between organic and traditional farming. **Toxicol Lett**, v. 230, n. 2, p. 166-176, 2014.

COSTA, L. G.; COLE, T. B.; VITALONE, A.; FURLONG, C. E. Measurement of paraoxonase (PON1) status as a potential biomarker of susceptibility to organophosphate toxicity. **Clin Chim Acta**, v. 352, n. 1-2, p. 37-47, 2005.

CRAIG, F. E.; FOON, K. A. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. **Blood**, v. 111, n. 8, p. 3941-3967, 2008.

DAMASCENO, D.; TEODOSIO, C.; VAN DEN BOSSCHE, W. B. L.; PEREZ-ANDRES, M.; ARRIBA-MÉNDEZ, S.; MUÑOZ-BELLVIS, L.; ROMERO, A.; BLANCO, J. F.; REMESAL, A.; PUIG, N.; MATARRAZ, S.; VICENTE-VILLARDÓN, J. L.; VAN DONGEN, J. J. M.; ALMEIDA, J.; ORFAO, A. Distribution of subsets of blood monocytic cells throughout life. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 144, n. 1, p. 320-323, 2019.

DANIEL, J. C.; CRISTINA, M. T. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 10, n. 7, p. 479, 2010.

DE JONG, D.; ROEMER, M. G.; CHAN, J. K.; GOODLAD, J.; GRATZINGER, D.; CHADBURN, A.; JAFFE, E. S.; SAID, J.; NATKUNAM, Y. B-Cell and Classical Hodgkin Lymphomas Associated With Immunodeficiency: 2015 SH/EAHP Workshop Report-Part 2. **Am J Clin Pathol**, v. 147, n. 2, p. 153-170, 2017.

DE MARIA, A.; BOZZANO, F.; CANTONI, C.; MORETTA, L. Revisiting human natural killer cell subset function revealed cytolytic CD56(dim)CD16+ NK cells as rapid producers of abundant IFN-gamma on activation. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 108, n. 2, p. 728, 2011.

DEVARAJAN, P.; CHEN, Z. Autoimmune effector memory T cells: the bad and the good. **Immunol. Res.**, v. 57, n. 1, p. 12-22, 2013.

DEVORE, L. J. **Probabilidade e estatística: para engenharia e ciências**. São Paulo, SP: Thomson Pioneira, 2006. 706 p., v., n., p., 2006.

DHOUIB, I.; JALLOULI, M.; ANNABI, A.; MARZOUKI, S.; GHARBI, N.; ELFAZAA, S.; LASRAM, M. M. From immunotoxicity to carcinogenicity: the effects of carbamate pesticides on the immune system. **Environ Sci Pollut Res Int**, v. 23, n. 10, p. 9448-9458, 2016.

DIEHL, S.; RINCÓN, M. The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. **Mol Immunol**, v. 39, n. 9, p. 531-536, 2002.

DRANOFF, G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. **Nat Rev Cancer**, v. 4, n. 1, p. 11-22, 2004.

ELLMEIER, W.; HAUST, L.; TSCHISMAROV, R. Transcriptional control of CD4 and CD8 coreceptor expression during T cell development. **Cell Mol Life Sci**, v. 70, n. 23, p. 4537-4553, 2013.

FARHOOD, B.; NAJAFI, M.; MORTEZAEI, K. CD8(+) cytotoxic T lymphocytes in cancer immunotherapy: A review. **J Cell Physiol**, v. 234, n. 6, p. 8509-8521, 2019.

FECTEAU, J. F.; CÔTÉ, G.; NÉRON, S. A new memory CD27-IgG+ B cell population in peripheral blood expressing VH genes with low frequency of somatic mutation. **J Immunol**, v. 177, n. 6, p. 3728-3736, 2006.

FIOCRUZ. 2019. **GT de Agrotóxicos da Fiocruz**. Disponível em: <[https://portal.fiocruz.br/sites/portal.fiocruz.br/files/documentos/agrotoxicos\\_fact\\_sheet\\_1\\_atualizacao.pdf](https://portal.fiocruz.br/sites/portal.fiocruz.br/files/documentos/agrotoxicos_fact_sheet_1_atualizacao.pdf)>. Acesso em: 02 fev. 2020.

FLORES-BORJA, F.; BOSMA, A.; NG, D.; REDDY, V.; EHRENSTEIN, M. R.; ISENBERG, D. A.; MAURI, C. CD19+CD24hiCD38hi B cells maintain regulatory T cells while limiting TH1 and TH17 differentiation. **Sci Transl Med**, v. 5, n. 173, p. 173ra123, 2013.

FRAZÃO, J. B.; ERRANTE, P. R.; CONDINO-NETO, A. Toll-like receptors' pathway disturbances are associated with increased susceptibility to infections in humans. **Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)**, v. 61, n. 6, p. 427-443, 2013.

FURMAN, D.; DAVIS, M. M. New approaches to understanding the immune response to vaccination and infection. **Vaccine**, v. 33, n. 40, p. 5271-5281, 2015.

FURST, A. Can Nutrition Affect Chemical Toxicity ? **Int. J. Toxicol.**, v. 21, n. 5, p. 419-424, 2002.

GALLOWAY, T.; HANDY, R. Immunotoxicity of Organophosphorous Pesticides. **Ecotoxicology**, v. 12, n. 1-4, p. 345-363, 2003.

EGINAT, J.; PARONI, M.; FACCIOTTI, F.; GRUARIN, P.; KASTIRR, I.; CAPRIOLI, F.; PAGANI, M.; ABRIGNANI, S. The CD4-centered universe of human T cell subsets. **Semin Immunol**, v. 25, n. 4, p. 252-262, 2013.

GERMAIN, R. N. T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. **Nat Rev Immunol**, v. 2, n. 5, p. 309-322, 2002.

GRANT, E. J.; QUINONES-PARRA, S. M.; CLEMENS, E. B.; KEDZIERSKA, K. Human influenza viruses and CD8(+) T cell responses. **Curr Opin Virol**, v. 16, n., p. 132-142, 2016.

GREEN, A. M.; DIFAZIO, R.; FLYNN, J. L. IFN- $\gamma$  from CD4 T Cells Is Essential for Host Survival and Enhances CD8 T Cell Function during Mycobacterium tuberculosis Infection. **J. Immunol.**, v. 190, n. 1, p. 270-277, 2013.

GRUENBACHER, G.; GANDER, H.; NUSSBAUMER, O.; NUSSBAUMER, W.; RAHM, A.; THURNHER, M. IL-2 Costimulation Enables Statin-Mediated Activation of Human NK Cells, Preferentially through a Mechanism Involving CD56+ Dendritic Cells. **Cancer Res.**, v. 70, n. 23, p. 9611-9620, 2010.

GUO, Y.; PATIL, N. K.; LUAN, L.; BOHANNON, J. K.; SHERWOOD, E. R. The biology of natural killer cells during sepsis. **Immunology**, v. 153, n. 2, p. 190-202, 2018.



HERMANOWICZ, A.; KOSSMAN, S. Neutrophil function and infectious disease in workers occupationally exposed to phosphoorganic pesticides: role of mononuclear-derived chemotactic factor for neutrophils. **Clin Immunol Immunopathol**, v. 33, n. 1, p. 13-22, 1984.

HIRANO, T.; YASUKAWA, K.; HARADA, H.; TAGA, T.; WATANABE, Y.; MATSUDA, T.; KASHIWAMURA, S.; NAKAJIMA, K.; KOYAMA, K.; IWAMATSU, A.; ET AL. Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. **Nature**, v. 324, n. 6092, p. 73-76, 1986.

HISCOTT, J.; WARE, C. Cytokines. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 23, n. 5, p. 561-563, 2011.

HOPPIN, J. A.; UMBACH, D. M.; LONDON, S. J.; LYNCH, C. F.; ALAVANJA, M. C.; SANDLER, D. P. Pesticides and adult respiratory outcomes in the agricultural health study. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1076, n., p. 343-354, 2006.

HUANG, F.; LIU, Q.; XIE, S.; XU, J.; HUANG, B.; WU, Y.; XIA, D. Cypermethrin Induces Macrophages Death through Cell Cycle Arrest and Oxidative Stress-Mediated JNK/ERK Signaling Regulated Apoptosis. **Int J Mol Sci**. v. 17, n. 6, p. 885, 2016.

HUANG, F.; CHEN, Z.; CHEN, H.; LU, W.; XIE, S.; MENG, Q. H.; WU, Y.; XIA, D. Cypermethrin Promotes Lung Cancer Metastasis via Modulation of Macrophage Polarization by Targeting MicroRNA-155/Bcl6. **Toxicol Sci**, v. 163, n. 2, p. 454-465, 2018.

HURST, S. M.; WILKINSON, T. S.; MCLOUGHLIN, R. M.; JONES, S.; HORIUCHI, S.; YAMAMOTO, N.; ROSE-JOHN, S.; FULLER, G. M.; TOPLEY, N.; JONES, S. A. Il-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment seen during acute inflammation. **Immunity**, v. 14, n. 6, p. 705-714, 2001.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Cidades e estados**. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/cidades-e-estados/sc/santo-amaro-da-imperatriz.html>>. Acesso em: 04 mar. 2020.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. Ministério da Saúde, 2015. **Posicionamento Do INCA Acerca Dos Agrotóxicos**. Disponível em: <[http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/comunicacao/posicionamento\\_do\\_inca\\_sobre\\_os\\_agrotoxicos\\_06\\_abr\\_15.pdf](http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/comunicacao/posicionamento_do_inca_sobre_os_agrotoxicos_06_abr_15.pdf)>. Acesso em: 30 jun. 2020.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. Ministério da Saúde, 2018. **Nota Pública Acerca Do Posicionamento Do Instituto Nacional De Câncer Sobre O Projeto De Lei Nº 6.299/2002**. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//nota-publica-inca-pl-6299-2002-11-de-maio-de-2018.pdf>>. Acesso em 01mar 2021.

ISER, B. P. M.; PINHEIRO, P. C.; MALTA, D. C.; DUNCAN, B. B.; SCHMIDT, M. I. Prediabetes and intermediate hyperglycemia prevalence in adults and associated factors, Health National Survey. **Cien Saude Colet**, v. 26, n. 2, p. 531-540, 2021.

- JIANG, Y.; CUI, X.; CUI, C.; ZHANG, J.; ZHOU, F.; ZHANG, Z.; FU, Y.; XU, J.; CHU, Z.; LIU, J.; HAN, X.; LIAO, C.; WANG, Y.; CAO, Y.; SHANG, H. The function of CD3+CD56+ NKT-like cells in HIV-infected individuals. **Biomed Res Int**, v. 2014, n., p. 863625, 2014.
- JULIER, Z.; PARK, A. J.; BRIQUEZ, P. S.; MARTINO, M. M. Promoting tissue regeneration by modulating the immune system. **Acta Biomater**, v. 53, n., p. 13-28, 2017.
- JUNTILLA, I. S. Tuning the Cytokine Responses: An Update on Interleukin (IL)-4 and IL-13 Receptor Complexes. **Front. Immunol**, v. 9, n. 888, p., 2018.
- KAK, G.; RAZA, M.; TIWARI, B. K. Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ): Exploring its implications in infectious diseases. **Biomolecular Concepts**, v. 9, n. 1, p. 64-79, 2018.
- KANEGANE, H.; HOSHINO, A.; OKANO, T.; YASUMI, T.; WADA, T.; TAKADA, H.; OKADA, S.; YAMASHITA, M.; YEH, T. W.; NISHIKOMORI, R.; TAKAGI, M.; IMAI, K.; OCHS, H. D.; MORIO, T. Flow cytometry-based diagnosis of primary immunodeficiency diseases. **Allergol Int**, v. 67, n. 1, p. 43-54, 2018.
- KANY, S.; VOLLRATH, J. T.; RELJA, B. Cytokines in Inflammatory Disease. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 20, n. 23, p. 6008, 2019.
- KAPELLOS, T. S.; BONAGURO, L.; GEMUND, I.; REUSCH, N.; SAGLAM, A.; HINKLEY, E. R.; SCHULTZE, J. L. Human Monocyte Subsets and Phenotypes in Major Chronic Inflammatory Diseases. **Front Immunol**, v. 10, n., p. 2035, 2019.
- KARASUYAMA H, YAMANISHI Y. Basophils have emerged as a key player in immunity. **Curr Opin Immunol**. Dec;31:1-7, 2014.
- KARED, H.; MARTELLI, S.; NG, T. P.; PENDER, S. L.; LARBI, A. CD57 in human natural killer cells and T-lymphocytes. **Cancer Immunol Immunother**, v. 65, n. 4, p. 441-452, 2016.
- KLEIN, U.; DALLA-FAVERA, R. Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. **Nat Rev Immunol**, v. 8, n. 1, p. 22-33, 2008.
- KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nat Rev Immunol**, v. 13, n. 3, p. 159-175, 2013.
- KRIJGSMAN, D.; HOKLAND, M.; KUPPEN, P. J. K. The Role of Natural Killer T Cells in Cancer-A Phenotypical and Functional Approach. **Front Immunol**, v. 9, n., p. 367, 2018.
- KRIJGSMAN, D.; DE VRIES, N. L.; SKOVBO, A.; ANDERSEN, M. N.; SWETS, M.; BASTIAANNET, E.; VAHRMEIJER, A. L.; VAN DE VELDE, C. J. H.; HEEMSKERK, M. H. M.; HOKLAND, M.; KUPPEN, P. J. K. Characterization of circulating T-, NK-, and NKT cell subsets in patients with colorectal cancer: the peripheral blood immune cell profile. **Cancer Immunol Immunother**, v. 68, n. 6, p. 1011-1024, 2019.
- LAKSHMI NARENDRA, B.; ESHVENDAR REDDY, K.; SHANTIKUMAR, S.; RAMAKRISHNA, S. Immune system: a double-edged sword in cancer. **Inflamm Res**, v. 62, n. 9, p. 823-834, 2013.

LAMBERT, C.; SACK, U. Monocytes and macrophages in flow cytometry. **Cytometry B Clin Cytom**, v. 92, n. 3, p. 178-179, 2017.

LEE, G. H.; CHOI, K. C. Adverse effects of pesticides on the functions of immune system. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, v. 235, n., p. 108789, 2020.

LEE, J.; TAM, H.; ADLER, L.; ILSTAD-MINNIHAN, A.; MACAUBAS, C.; MELLINS, E. D. The MHC class II antigen presentation pathway in human monocytes differs by subset and is regulated by cytokines. **PLoS ONE**, v. 12, n. 8, p. e0183594, 2017.

LEE, T. P.; MOSCATI, R.; PARK, B. H. Effects of pesticides on human leukocyte functions. **Res Commun Chem Pathol Pharmacol**, v. 23, n. 3, p. 597-609, 1979.

LELIEFELD, P. H.; WESSELS, C. M.; LEENEN, L. P.; KOENDERMAN, L.; PILLAY, J. The role of neutrophils in immune dysfunction during severe inflammation. **Crit Care**, v. 20, n., p. 73, 2016.

LENG, S. X.; MCELHANEY, J. E.; WALSTON, J. D.; XIE, D.; FEDARKO, N. S.; KUCHEL, G. A. ELISA and multiplex technologies for cytokine measurement in inflammation and aging research. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, v. 63, n. 8, p. 879-884, 2008.

LERRO, C. C.; BEANE FREEMAN, L. E.; DELLAVALLE, C. T.; ANDREOTTI, G.; HOFMANN, J. N.; KOUTROS, S.; PARKS, C. G.; SHRESTHA, S.; ALAVANJA, M. C. R.; BLAIR, A.; LUBIN, J. H.; SANDLER, D. P.; WARD, M. H. Pesticide exposure and incident thyroid cancer among male pesticide applicators in agricultural health study. **Environ Int**, v. 146, n., p. 106187, 2021.

LEY, K.; HOFFMAN, H. M.; KUBES, P.; CASSATELLA, M. A.; ZYCHLINSKY, A.; HEDRICK, C. C.; CATZ, S. D. Neutrophils: New insights and open questions. **Sci Immunol**, v. 3, n. 30, p., 2018.

LI, Q.; NAGAHARA, N.; TAKAHASHI, H.; TAKEDA, K.; OKUMURA, K. Organophosphorus pesticides markedly inhibit the activities of natural killer, cytotoxic T lymphocyte and lymphokine-activated killer: a proposed inhibiting mechanism via granzyme inhibition. **Toxicology**, v. 172, n. 3, p. 181-190, 2002.

LI, Q.; KOBAYASHI, M.; KAWADA, T. Effect of carbamate pesticides on perforin, granzymes A-B-3/K, and granulysin in human natural killer cells. **Int J Immunopathol Pharmacol**, v. 28, n. 3, p. 403-410, 2015.

LIEW, P. X.; KUBES, P. The Neutrophil's Role During Health and Disease. **Physiol Rev**, v. 99, n. 2, p. 1223-1248, 2019.

LUEBKE, B. Pesticide-Induced Immunotoxicity: Are Humans at Risk? **Hum Ecol Risk Assess**, v. 8, n. 2, p. 293-303, 2002.

- LUNA, J. M.; MOON, Y. P.; LIU, K. M.; SPITALNIK, S.; PAIK, M. C.; CHEUNG, K.; SACCO, R. L.; ELKIND, M. S. High-sensitivity C-reactive protein and interleukin-6-dominant inflammation and ischemic stroke risk: the northern Manhattan study. **Stroke**, v. 45, n. 4, p. 979-987, 2014.
- MADDALON, A.; GALBIATI, V.; COLOSIO, C.; MANDIĆ-RAJČEVIĆ, S.; CORSINI, E. Glyphosate-based herbicides: Evidence of immune-endocrine alteration. **Toxicology**, v. 459, n., p. 152851, 2021.
- MAGALHÃES, A. F. A.; CALDAS, E. D. Occupational exposure and poisoning by chemical products in the Federal District. **Rev Bras Enferm**, v. 72, n., p. 32-40, 2019.
- MAMANE, A.; BALDI, I.; TESSIER, J. F.; RAHERISON, C.; BOUVIER, G. Occupational exposure to pesticides and respiratory health. **Eur Respir Rev**, v. 24, n. 136, p. 306-319, 2015.
- MARONI, M.; COLOSIO, C.; FERIOLI, A.; FAIT, A. Biological Monitoring of Pesticide Exposure: a review. Introduction. **Toxicology**, v. 143, n. 1, p. 1-118, 2000.
- MATSUMOTO, M.; BABA, A.; YOKOTA, T.; NISHIKAWA, H.; OHKAWA, Y.; KAYAMA, H.; KALLIES, A.; NUTT, S. L.; SAKAGUCHI, S.; TAKEDA, K.; KUROSAKI, T.; BABA, Y. Interleukin-10-producing plasmablasts exert regulatory function in autoimmune inflammation. **Immunity**, v. 41, n. 6, p. 1040-1051, 2014.
- MCGEACHY, M. J.; CUA, D. J.; GAFFEN, S. L. The IL-17 Family of Cytokines in Health and Disease. **Immunity**, v. 50, n. 4, p. 892-906, 2019.
- MCHEYZER-WILLIAMS, L. J.; MCHEYZER-WILLIAMS, M. G. ANTIGEN-SPECIFIC MEMORY B CELL DEVELOPMENT. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 23, n. 1, p. 487-513, 2004.
- MCLOUGHLIN, R. M.; JENKINS, B. J.; GRAIL, D.; WILLIAMS, A. S.; FIELDING, C. A.; PARKER, C. R.; ERNST, M.; TOPLEY, N.; JONES, S. A. IL-6 trans-signaling via STAT3 directs T cell infiltration in acute inflammation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 27, p. 9589-9594, 2005.
- MERAD, M.; SATHE, P.; HELFT, J.; MILLER, J.; MORTHA, A. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. **Annu Rev Immunol**, v. 31, n., p. 563-604, 2013.
- MIOT, H. A. Tamanho da amostra em estudos clínicos e experimentais. **J Vasc Bras**, v. 10, n. 4, p., 2011.
- MOKARIZADEH, A.; FARYABI, M. R.; REZVANFAR, M. A.; ABDOLLAHI, M. A comprehensive review of pesticides and the immune dysregulation: mechanisms, evidence and consequences. **Toxicol Mech Methods**, v. 25, n. 4, p. 258-278, 2015.
- MONTGOMERY, M. P.; KAMEL, F.; SALDANA, T. M.; ALAVANJA, M. C.; SANDLER, D. P. Incident diabetes and pesticide exposure among licensed pesticide applicators: Agricultural Health Study, 1993-2003. **Am J Epidemiol**, v. 167, n. 10, p. 1235-1246, 2008.

MOORE, K. W.; MALEFYT, R. D. W.; COFFMAN, R. L.; O'GARRA, A. Interleukin-10 and the Interleukin-10 Receptor. **Annu Rev Immunol**, v. 19, n. 1, p. 683-765, 2001.

MORANDI, F.; DI CARLO, E.; FERRONE, S.; PETRETTO, A.; PISTOIA, V.; AIROLDI, I. IL-27 in human secondary lymphoid organs attracts myeloid dendritic cells and impairs HLA class I-restricted antigen presentation. **J. Immun., Balt.**, v. 192, n. 6, p. 2634, 2014.

MOSTAFALOU, S.; ABDOLLAHI, M. Pesticides and human chronic diseases: Evidences, mechanisms, and perspectives. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 268, n. 2, p. 157-177, 2013.

MULLER, Y. D.; GOLSHAYAN, D.; EHIRCHIOU, D.; WYSS, J. C.; GIOVANNONI, L.; MEIER, R.; SERRE-BEINIER, V.; PUGA YUNG, G.; MOREL, P.; BÜHLER, L. H.; SEEBACH, J. D. Immunosuppressive effects of streptozotocin-induced diabetes result in absolute lymphopenia and a relative increase of T regulatory cells. **Diabetes**, v. 60, n. 9, p. 2331-2340, 2011.

NDLOVU, V.; DALVIE, M. A.; JEEBHAY, M. F. Asthma associated with pesticide exposure among women in rural Western Cape of South Africa. **Am J Ind Med**, v. 57, n. 12, p. 1331-1343, 2014.

NEGISHI, Y.; TAKAHASHI, H.; KUWABARA, Y.; TAKESHITA, T. Innate immune cells in reproduction. **J Obstet Gynaecol Res**, v. 44, n. 11, p. 2025-2036, 2018.

NELSON, L. H.; LENZ, K. M. The immune system as a novel regulator of sex differences in brain and behavioral development. **J Neurosci Res**, v. 95, n. 1-2, p. 447-461, 2017.

NNODU, U.; WHALEN, M. M. Pentachlorophenol decreases ATP levels in human natural killer cells. **J Appl Toxicol**, v. 28, n. 8, p. 1016-1020, 2008.

O'KEEFFE, M.; MOK, W. H.; RADFORD, K. J. Human dendritic cell subsets and function in health and disease. **Cell Mol Life Sci**, v. 72, n. 22, p. 4309-4325, 2015.

OBOSHI, W.; AKI, K.; TADA, T.; WATANABE, T.; YUKIMASA, N.; UENO, I.; SAITO, K.; HOSOI, E. Flow cytometric evaluation of surface cd56 expression on activated natural killer cells as functional marker. **J. Med. Invest.**, v. 63, n. 3-4, p. 199-203, 2016.

OKADA, M.; KITAHARA, M.; KISHIMOTO, S.; MATSUDA, T.; HIRANO, T.; KISHIMOTO, T. IL-6/BSF-2 functions as a killer helper factor in the in vitro induction of cytotoxic T cells. **J Immunol**. v. 141, n. 5, p. 1543-1549, 1988.

ONISHI, R. M.; GAFFEN, S. L. Interleukin-17 and its target genes: mechanisms of interleukin-17 function in disease. **Immunology**, v. 129, n. 3, p. 311-321, 2010.

PALACIOS, E. H.; WEISS, A. Function of the Src-family kinases, Lck and Fyn, in T-cell development and activation. **Oncogene**, v. 23, n. 48, p. 7990-8000, 2004.

- PARANÁ. Secretaria de Estado da Saúde do Paraná. Superintendência de Vigilância em Saúde. **Material Técnico - Intoxicações Agudas por Agrotóxicos. Atendimento Inicial do Paciente Intoxicado.** Curitiba; 120 p., 2018.
- PARK, S.; KIM, S. K.; KIM, J. Y.; LEE, K.; CHOI, J. R.; CHANG, S. J.; CHUNG, C. H.; PARK, K. S.; OH, S. S.; KOH, S. B. Exposure to pesticides and the prevalence of diabetes in a rural population in Korea. **Neurotoxicology**, v. 70, n., p. 12-18, 2019.
- PATENTE, T. A.; PINHO, M. P.; OLIVEIRA, A. A.; EVANGELISTA, G. C. M.; BERGAMI-SANTOS, P. C.; BARBUTO, J. A. M. Human Dendritic Cells: Their Heterogeneity and Clinical Application Potential in Cancer Immunotherapy. **Front Immunol**, v. 9, n., p. 3176, 2018.
- PEILLEX, C.; PELLETIER, M. The impact and toxicity of glyphosate and glyphosate-based herbicides on health and immunity. **J Immunotoxicol**, v. 17, n. 1, p. 163-174, 2020.
- PEREZ-ANDRES, M.; PAIVA, B.; NIETO, W. G.; CARAUX, A.; SCHMITZ, A.; ALMEIDA, J.; VOGT, R. F., JR.; MARTI, G. E.; RAWSTRON, A. C.; VAN ZELM, M. C.; VAN DONGEN, J. J.; JOHNSEN, H. E.; KLEIN, B.; ORFAO, A. Human peripheral blood B-cell compartments: a crossroad in B-cell traffic. **Cytometry B Clin Cytom**, v. 78 Suppl 1, n., p. S47-60, 2010.
- POCKLEY, A. G.; FOULDS, G. A.; OUGHTON, J. A.; KERKVLIT, N. I.; MULTHOFF, G. Immune Cell Phenotyping Using Flow Cytometry. **Curr. protoc. toxicol.**, v. 66, n. 1, p. 18.18.11-18.18.34, 2015.
- POYNTER, J. N.; RICHARDSON, M.; ROESLER, M.; BLAIR, C. K.; HIRSCH, B.; NGUYEN, P.; CIOC, A.; CERHAN, J. R.; WARLICK, E. Chemical exposures and risk of acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes in a population-based study. **Int. J. Cancer Res.**, v. 140, n. 1, p. 23-33, 2017.
- QUEIROZ, M. L.; FERNANDES, M. D.; VALADARES, M. C. Neutrophil function in workers exposed to organophosphate and carbamate insecticides. **Int J Immunopharmacol**, v. 21, n. 4, p. 263-270, 1999.
- RAJE, N.; DINAKAR, C. Overview of Immunodeficiency Disorders. **Immunol Allergy Clin North Am**, v. 35, n. 4, p. 599-623, 2015.
- REIZIS, B. Plasmacytoid Dendritic Cells: Development, Regulation, and Function. **Immunity**, v. 50, n. 1, p. 37-50, 2019.
- REVENFELD, A. L.; STEFFENSEN, R.; PUGHOLM, L. H.; JØRGENSEN, M. M.; STENSALLE, A.; VARMING, K. Presence of HLA-DR Molecules and HLA-DRB1 mRNA in Circulating CD4(+) T Cells. **Scand J Immunol**, v. 84, n. 4, p. 211-221, 2016.
- RICHTER, R. J.; JARVIK, G. P.; FURLONG, C. E. Paraoxonase 1 (PON1) status and substrate hydrolysis. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 235, n. 1, p. 1-9, 2009.
- ROSSER, E. C.; MAURI, C. Regulatory B cells: origin, phenotype, and function. **Immunity**, v. 42, n. 4, p. 607-612, 2015.

- ROWE, A. M.; BRUNDAGE, K. M.; BARNETT, J. B. In vitro atrazine-exposure inhibits human natural killer cell lytic granule release. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 221, n. 2, p. 179-188, 2007.
- SALAMEH, P. R.; WAKED, M.; BALDI, I.; BROCHARD, P.; SALEH, B. A. Chronic bronchitis and pesticide exposure: a case-control study in Lebanon. **Eur J Epidemiol**, v. 21, n. 9, p. 681-688, 2006.
- SALLUSTO, F.; LANGENKAMP, A.; GEGINAT, J.; LANZAVECCHIA, A. Functional subsets of memory T cells identified by CCR7 expression. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 251, n., p. 167-171, 2000.
- SALOMON, B. L.; LECLERC, M.; TOSELLO, J.; RONIN, E.; PIAGGIO, E.; COHEN, J. L. Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  and Regulatory T Cells in Oncoimmunology. **Front. Immunol.**, v. 9, n. 444, p., 2018.
- SAMJI, T.; KHANNA, K. M. Understanding memory CD8(+) T cells. **Immunol. Lett.**, v. 185, n., p. 32-39, 2017.
- SARAIVA, M.; O'GARRA, A. The regulation of IL-10 production by immune cells. **Nat Rev Immunol**, v. 10, n. 3, p. 170-181, 2010.
- SATTLER, S. The Role of the Immune System Beyond the Fight Against Infection. **Adv Exp Med Biol**, v. 1003, n., p. 3-14, 2017.
- SCHÄFER, M.; KOPPE, F.; STENGER, B.; BROCHHAUSEN, C.; SCHMIDT, A.; STEINRITZ, D.; THIERMANN, H.; KIRKPATRICK, C. J.; POHL, C. Influence of organophosphate poisoning on human dendritic cells. **Chem. Biol. Interact**, v. 206, n. 3, p. 472-478, 2013.
- SCHAPER, F.; ROSE-JOHN, S. Interleukin-6: Biology, signaling and strategies of blockade. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 26, n. 5, p. 475-487, 2015.
- SCHIFFRIN, E. L. Immune mechanisms in hypertension and vascular injury. **Clin Sci (Lond)**, v. 126, n. 4, p. 267-274, 2014.
- SCHINASI, L.; LEON, M. Non-Hodgkin Lymphoma and Occupational Exposure to Agricultural Pesticide Chemical Groups and Active Ingredients: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Int. J. Environ. Res.**, v. 11, n. 4, p. 4449-4527, 2014.
- SCHRODER, K.; HERTZOG, P. J.; RAVASI, T.; HUME, D. A. Interferon- $\gamma$ : an overview of signals, mechanisms and functions. **J. Leukoc. Biol.**, v. 75, n. 2, p. 163-189, 2004.
- SHADNIA, S.; ABDOLLAHI, M.; AZIZI, E. Evaluation of oxidative stress and genotoxicity in organophosphorus insecticide workers. **Toxicol. Lett.**, v. 164, n., p. S69-S69, 2006.

SHEIL, J. M.; FRANKENBERRY, M. A.; SCHELL, T. D.; BRUNDAGE, K. M.; BARNETT, J. B. Propanil exposure induces delayed but sustained abrogation of cell-mediated immunity through direct interference with cytotoxic T-lymphocyte effectors. **Environ. Health Perspect.**, v. 114, n. 7, p. 1059, 2006.

SHERWOOD, G. Waldenstrom's Macroglobulinemia - **Basic Immunology**. 2.ed. Sarasota: International Waldenstrom's Macroglobulinemia Foundation (IWMF), 2018.

SIMONIELLO, M. F.; KLEINSORGE, E. C.; SCAGNETTI, J. A.; MASTANDREA, C.; GRIGOLATO, R. A.; PAONESSA, A. M.; CARBALLO, M. A. Biomarkers of cellular reaction to pesticide exposure in a rural population. **Biomarkers**, v. 15, n. 1, p. 52-60, 2010.

SLAUENWHITE, D.; JOHNSTON, B. Regulation of NKT Cell Localization in Homeostasis and Infection. **Front Immunol**, v. 6, n., p. 255, 2015.

SO, J.; AHN, J.; LEE, T.-H.; PARK, K.-H.; PAIK, M.-K.; JEONG, M.; CHO, M.-H.; JEONG, S.-H. Comparison of International Guidelines of Dermal Absorption Tests Used in Pesticides Exposure Assessment for Operators. **Toxicol. Res.**, v. 30, n. 4, p. 251-260, 2014.

STREITZ, M.; MILOUD, T.; KAPINSKY, M.; REED, M. R.; MAGARI, R.; GEISLER, E. K.; HUTCHINSON, J. A.; VOGT, K.; SCHLICKEISER, S.; KVERNELAND, A. H.; MEISEL, C.; VOLK, H. D.; SAWITZKI, B. Standardization of whole blood immune phenotype monitoring for clinical trials: panels and methods from the ONE study. **Transplant Res**, v. 2, n. 1, p. 17, 2013.

TARKOWSKI, M.; LUTZ, W.; BIRINDELLI, S. The lymphocytic cholinergic system and its modulation by organophosphorus pesticides. **Int J Occup Med Environ Health**, v. 17, n. 3, p. 325, 2004.

TAYLOR, T. R.; TUCKER, T.; WHALEN, M. M. Persistent inhibition of human natural killer cell function by ziram and pentachlorophenol. **Environ Toxicol**, v. 20, n. 4, p. 418-424, 2005.

TAYLOR, T. R.; WHALEN, M. M. Effects of ziram on tumor-cell-binding capacity, cell-surface marker expression, and ATP levels of human natural killer cells. **Cell Biol Toxicol**, v. 25, n. 5, p. 447-455, 2009.

TKACH, M.; KOWAL, J.; ZUCCHETTI, A. E.; ENSERINK, L.; JOUVE, M.; LANKAR, D.; SAITAKIS, M.; MARTIN-JAULAR, L.; THÉRY, C. Qualitative differences in T-cell activation by dendritic cell-derived extracellular vesicle subtypes. **Embo j**, v. 36, n. 20, p. 3012-3028, 2017.

TU, W.; XU, C.; LU, B.; LIN, C.; WU, Y.; LIU, W. Acute exposure to synthetic pyrethroids causes bioconcentration and disruption of the hypothalamus-pituitary-thyroid axis in zebrafish embryos. **Sci Total Environ**, v. 542, n. Pt A, p. 876-885, 2016.

TURNER, A. K.; BEGON, M.; JACKSON, J. A.; BRADLEY, J. E.; PATERSON, S. Genetic diversity in cytokines associated with immune variation and resistance to multiple pathogens in a natural rodent population. **PLoS Genet**, v. 7, n. 10, p. e1002343, 2011.



USTYUGOVA, I. V.; FROST, L. L.; VAN DYKE, K.; BRUNDAGE, K. M.; SCHAFER, R.; BARNETT, J. B. 3,4-dichloropropionaniline suppresses normal macrophage function. **Toxicol Sci**, v. 97, n. 2, p. 364-374, 2007.

VAN DONGEN, J. J. M.; VAN DER BURG, M.; KALINA, T.; PEREZ-ANDRES, M.; MEJSTRIKOVA, E.; VLKOVA, M.; LOPEZ-GRANADOS, E.; WENTINK, M.; KIENZLER, A. K.; PHILIPPÉ, J.; SOUSA, A. E.; VAN ZELM, M. C.; BLANCO, E.; ORFAO, A. EuroFlow-Based Flowcytometric Diagnostic Screening and Classification of Primary Immunodeficiencies of the Lymphoid System. **Front Immunol**, v. 10, n., p. 1271, 2019.

VIGNALI, D. A.; COLLISON, L. W.; WORKMAN, C. J. How regulatory T cells work. **Nat Rev Immunol**, v. 8, n. 7, p. 523-532, 2008.

WAFI, T.; NADIA, K.; AMEL, N.; IKBAL, C.; INSAF, T.; ASMA, K.; HEDI, M. A.; MOHAMED, H. Oxidative stress, hematological and biochemical alterations in farmers exposed to pesticides. **J. Environ. Sci. Health, Part B**, v. 48, n. 12, p. 1058-1069, 2013.

WANG, C. Y.; WU, C. L.; TSAN, Y. T.; HSU, J. Y.; HUNG, D. Z.; WANG, C. H. Early onset pneumonia in patients with cholinesterase inhibitor poisoning. **Respirology**, v. 15, n. 6, p. 961-968, 2010.

WANG, L.; FU, Y.; CHU, Y. Regulatory B Cells. **Adv Exp Med Biol**, v. 1254, n., p. 87-103, 2020.

WANG, X.; HE, B.; KONG, B.; WEI, L.; WANG, R.; ZHOU, C.; SHAO, Y.; LIN, J.; JIN, Y.; FU, Z.  $\beta$ -Cypermethrin and its metabolite 3-phenoxybenzoic acid exhibit immunotoxicity in murine macrophages. **Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)**, v. 49, n. 12, p. 1083-1091, 2017.

XIA, C.; WANG, M.; LIANG, Q.; YUN, L.; KANG, H.; FAN, L.; WANG, D.; ZHANG, G. Changes in monoclonal HLA-DR antigen expression in acute organophosphorus pesticide-poisoned patients. **Exp Ther Med**, v. 7, n. 1, p. 137-140, 2014.

ZHAN, Y.; CHOW, K. V.; SOO, P.; XU, Z.; BRADY, J. L.; LAWLOR, K. E.; MASTERS, S. L.; O'KEEFFE, M.; SHORTMAN, K.; ZHANG, J.-G.; LEW, A. M. Plasmacytoid dendritic cells are short-lived: reappraising the influence of migration, genetic factors and activation on estimation of lifespan. **Sci. Rep.**, v. 6, n. 1, p. 25060, 2016.

ZHEN, Y.; SUN, L.; LIU, H.; DUAN, K.; ZENG, C.; ZHANG, L.; JIN, D.; PENG, J.; DING, W.; ZHAO, Y. Alterations of peripheral CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T regulatory cells in mice with STZ-induced diabetes. **Cell Mol Immunol**, v. 9, n. 1, p. 75-85, 2012.

## APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA**  
**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

### I – DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU LEGAL RESPONSÁVEL

1. Nome do Paciente: \_\_\_\_\_
2. Telefone: \_\_\_\_\_
3. Nome da mãe: \_\_\_\_\_
4. Sexo: ( )M                      ( )F                      Data de Nascimento:...../...../.....

### II – DADOS SOBRE A PESQUISA

1. **Título do Protocolo de Pesquisa:** Estudo de população exposta ocupacionalmente a agrotóxicos
2. **Pesquisador Principal:** Claudia Regina dos Santos  
**Cargo/Função:** Professor Adjunto IV  
**Departamento da UFSC:** Departamento de Patologia

### III – EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA:

1. Este estudo tem como objetivo avaliar os efeitos dos agrotóxicos na sua saúde. Esclarecemos ainda que somente serão analisados os pontos descritos, não sendo, portanto realizados outros exames.
2. Aceitando participar deste estudo, você responderá um questionário que tem por objetivo conhecer um pouco de seus hábitos, seu estado de saúde e seu histórico relacionado ao trabalho. Você será encaminhado ao Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina onde será avaliado por um endocrinologista e neurologista e as informações contidas no seu prontuário poderão consultadas no decorrer da pesquisa.
3. Serão realizadas, dependendo da necessidade exames por imagem (ultrassonografias) E ainda, será coletada de sua pessoa uma amostra de sangue (20 ml), ou por ventura uma segunda amostra se for necessária nova avaliação. No seu sangue serão avaliados parâmetros relacionados à função endócrina, hematológica, reumatológica, e indicadores de exposição, efeito e genotoxicidade.
4. A coleta será realizada por profissional qualificado, utilizando material descartável, seguindo os procedimentos de assepsia adequados, garantindo assim a sua integridade física.

5. Todas as análises serão realizadas, de modo a não representar nenhum custo financeiro, para você.
6. Você terá acesso a todos os resultados e caso necessite o encaminhamento para acompanhamento.

---

#### **IV – ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA**

1. Você tem assegurado o direito de a qualquer momento do estudo solicitar informações esclarecedoras sobre o andamento dos procedimentos, bem como dos eventuais riscos e benefícios relacionados a sua participação neste estudo, através dos telefones **(48) 37215069/91486213** (pesquisador), **37219206** (Comitê de Ética em Pesquisa) ou e-mail [claudia.santos@ufsc.br](mailto:claudia.santos@ufsc.br).
2. Fica assegurado também que no caso de eventual intercorrência no momento da coleta, o Sr. receberá tratamento adequado e será monitorado até que sua condição de saúde se restabeleça. (Não são esperados problemas deste tipo, no entanto é importante garantir assistência no caso de qualquer intercorrência relacionada ao projeto).
3. Os pesquisadores declaram que cumprirão as exigências contidas na Resolução CNS 466/2012 e que o sigilo dos participantes será garantido durante todas as etapas da pesquisa, inclusive na divulgação dos resultados. Os resultados do estudo serão publicados sem revelar sua identidade, entretanto estarão disponíveis para consulta pela equipe envolvida no projeto, e pelo Comitê de Ética.

---

#### **V – CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO**

Concordo em participar do presente Protocolo de Pesquisa bem como com a utilização dos dados coletados, desde que seja mantido o sigilo de minha identificação, conforme normas do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos. A minha participação é voluntária podendo ser suspensa a qualquer momento. Pelo presente consentimento, declaro que fui esclarecido sobre a pesquisa a ser realizada, de forma detalhada, livre de qualquer constrangimento e obrigação, e que recebi uma cópia deste termo, assinada pelos pesquisadores.

Florianópolis, ..... de ..... de 20...

---

Assinatura do participante

---

Claudia Regina dos Santos - Pesquisador Principal  
(48)37215069 / 91486213  
Email: [claudia.santos@ufsc.br](mailto:claudia.santos@ufsc.br)

## APÊNDICE B - QUESTIONÁRIO EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA**  
**AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL A AGROTÓXICOS**

1. Questionário número: \_\_\_ N° SUS: \_\_\_\_\_  
 2. Data: \_\_ / \_\_ / \_\_ Prontuário n° \_\_\_\_\_  
 3. Localidade: \_\_\_\_\_

### DADOS SÓCIO-DEMOGRÁFICOS – PARTE I

4. Nome do entrevistado: \_\_\_\_\_  
 5. Data de nascimento: \_\_ / \_\_ / \_\_ Idade: \_\_\_ anos completos  
 6. Nome da mãe: \_\_\_\_\_  
 7. Local de nascimento: Cidade \_\_\_\_\_ Estado \_\_\_\_\_  
 8. Cor:  
 Branca  Negra  Pardo  Outra: \_\_\_\_\_  
 9. Estado civil atual:  solteiro  casado  com companheira  viúvo  
 separado/divorciado/desquitado  
 10. Até que ano (série) você estudou na escola?  
 Completei o (a) \_\_\_\_\_ ano (série) do \_\_\_\_\_ na escola.  
 11. Qual sua religião?  
 sem religião  Católica  protestante/crente/evangélico  espírita  outra \_\_\_\_\_

### EXPOSIÇÃO A AGENTES QUÍMICOS (Assinale quando SIM)

12. O que você planta? \_\_\_\_\_  
 13. Quanto você produz anualmente? \_\_\_\_\_  
 14. Qual o período da(s) safra(s)? \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 15. Quando você faz a aplicação de agrotóxicos durante a safra? \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 16. Na época de aplicação de agrotóxicos, quantos dias por semana você aplica? \_\_\_\_\_  
 17. Quantas horas duram as aplicações? \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 18. Em qual turno você normalmente aplica?  
 Matutino  Vespertino

19. Quais agrotóxicos você utiliza atualmente? Marque o número correspondente ao formulário, ou escreva por extenso o nome comercial ou do ingrediente ativo.

---

---

---

---

---

---

20. Você se lembra qual agrotóxicos você mais usava há 20 anos atrás?

---

21. Como você compra os agrotóxicos?

Com receituário  Através de amigos

22. Você lê as bulas antes de utilizar o produto?

Sim  Não

23. Quantas vezes por semana você utiliza?

Uma  Pelo menos duas  3 ou mais

24. O que você faz com o agrotóxico?

Prepara a calda  aplica o produto

25. Como você faz a aplicação?

Pulverizador costal  Máquina

26. Quando foi a sua última exposição? \_\_\_\_\_ horas ou \_\_\_\_\_ dias

27. Qual(is) foi(RAM) o agrotóxico(s) utilizado(s)?

---

---

28. Você utiliza algum EPI?

Sim  Não

29. Qual EPI você utiliza?

Máscaras  Luvas  Botas  Roupas de manga comprida

30. Após o manuseio do agrotóxico você:

Continua normalmente suas atividades

Lava as mãos antes de continuar suas atividades

Toma banho antes de continuar suas atividades

31. Ao aplicar os agrotóxicos molha a roupa:

Todos os dias  Às vezes

32. Como você faz o descarte da embalagem?

Joga Fora  Reutiliza  Outro/Como: \_\_\_\_\_

HISTÓRIA OCUPACIONAL (escrever no verso se necessário)

33. Quantos anos você tinha quando começou a trabalhar? \_\_\_ \_\_ anos

34. Que trabalhos executou desde então? Por quanto tempo?

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

35. Função/atividade empresa ou localidade, município período:

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Conferir se o tempo de trabalho referido nas perguntas acima corresponde ao tempo de trabalho de toda historia ocupacional. Se não, completar.

TABAGISMO

36. Você já fumou?:

sim, ainda fuma  não/nunca  sim, mas parou há \_\_\_ anos

37. Há quantos anos você fuma ou durante quantos anos você fumou?

Há \_\_\_ anos OU há \_\_\_ meses OU durante \_\_\_ anos

38. O que você fuma ou fumou MAIS?

cigarro comercial  cigarro de palha  charuto  cachimbo

outro: \_\_\_\_\_

39. Quantos CIGARROS em média você fuma ou fumava por dia ou por semana?

\_\_\_\_\_ cigarros/dia OU \_\_\_\_\_ cigarros/semana

40. Se já parou de fumar, por que você parou?  NSA \_\_\_\_\_

CONSUMO DE BEBIDA ALCOÓLICA

41. Qual bebida você mais gosta de beber? \_\_\_\_\_

42. Com que idade você começou a beber? \_\_\_ \_\_ anos

43. Qual bebida você costuma(va) beber mais freqüentemente?

cerveja  cachaça  outra: \_\_\_\_\_

44. Quantas doses você costuma(va) beber por semana?

Um drinque ou uma é: uma cerveja longneck ou latinha; meia cerveja grande (600 ml) ou chopp (350 ml); uma dose de pinga, uísque ou outro destilado (50 ml) ou uma taça de vinho (150 ml).

Cerveja ou Chopp: \_\_\_ Cachaça ou uísque \_\_\_ Vinho: \_\_\_

Anotar frequência por mês, se necessário: \_\_\_\_\_

#### CONSUMO DE ALIMENTOS E ÁGUA

45. Você se alimenta de:

Carnes e verduras  Não come carne  Mais de uma porção de carne vermelha todos os dias

46. Qual a sua fonte de alimentos (carnes e verduras)?

Produção própria  compra dos vizinhos  supermercado

47. Qual a sua fonte de água?

Córrego próximo a casa  Fonte de água natural  Água encanada  
 Poço artesiano

48. Onde são descartados os resíduos de seu banheiro?

Há saneamento básico  Diretamente no córrego

49. Você toma chimarrão?

Todos os dias  Algumas vezes por semana

#### MEDICAMENTOS

50. Você costuma tomar algum remédio por conta própria?

Sim  Não

Quais? \_\_\_\_\_

51. Com que frequência?

Diariamente  Semanalmente  De vez em quando

52. Você toma algum medicamento prescrito pelo seu médico?

Sim  Não

Quais? \_\_\_\_\_

53. Com que frequência?

Diariamente  Semanalmente  De vez em quando

## DADOS SÓCIO-DEMOGRÁFICOS – PARTE II

54. Quais e quantos destes itens você possui em sua casa?

	Tem	Não tem	1	2	3	4
Televisão em cores						
Video cassete ou DVD/Bluray						
Rádio						
Banheiro						
Automóvel						
Máquina de lavar						
Geladeira						
Freezer (independente ou parte da geladeira duplex)						
Trator/Colheiradeira						
Computador de mesa/ Notebook ou Tablet						
Ordenhadeira Elétrica						



**APÊNDICE C – QUESTIONÁRIO HISTÓRICO CLÍNICO****UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA****CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE****DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA****AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL A AGROTÓXICOS**

1. Questionário número: \_ \_ \_

2. Data: \_\_ / \_\_ / \_\_

3. Nome do entrevistado: \_\_\_\_\_

**HISTÓRIA CLÍNICA**

4. Você já passou mal alguma vez após aplicação que te fez procurar atendimento?

 Sim  Não

5. Quantas vezes? \_\_\_\_\_

6. Como foi? \_\_\_\_\_

7. Queixa atual: \_\_\_\_\_

8. Você tem filhos?

 sim  não

9. Você teve alguma complicação na gravidez?

 sim  não

Qual? \_\_\_\_\_

10. Já teve algum aborto espontâneo?

 sim  não

Quantos? \_\_\_\_\_

11. Está na menopausa?

 Sim  Não

12. Com que idade iniciou? \_\_\_\_\_

13. Os ciclos são regulares? \_\_\_\_\_

**INTERROGATÓRIO SOBRE DIFERENTES PATOLOGIAS****DIABETES**

14. Você tem diabetes

 Sim  Não  Não sabe

Há quanto tempo? \_\_\_\_\_ anos

15. Alguém da sua família em 1º grau tem diabetes?

Sim  Não  Não sabe

Quem: \_\_\_\_\_ Há quanto tempo? \_\_\_\_\_ anos

#### HIPOTIREODISMO

16. Você tem algum problema na tireóide?

Sim  Não  Não sabe

Há quanto tempo? \_\_\_\_\_ anos

17. Alguém da sua família tem esse problema?

Sim  Não  Não sabe

Quem: \_\_\_\_\_ Há quanto tempo? \_\_\_\_\_ anos

#### DEPRESSÃO E ANSIEDADE

Marque com um 'X' a resposta que melhor corresponder com o que o paciente refere sentir na ÚLTIMA SEMANA. Não é preciso ficar pensando muito em cada questão. Neste questionário as respostas espontâneas têm mais valor do que aquelas em que se pensa muito. Marque apenas uma resposta para cada pergunta.

18. Quando você se sente tenso(a) ou contraído(a)?

3  A maior parte do tempo

2  Boa parte do tempo

1  De vez em quando

0  Nunca

19. Você sente gosto pelas mesmas coisas de antes?

0  Sim, do mesmo jeito que antes

1  Não tanto quanto antes

2  Só um pouco

3  Já não sinto mais prazer em nada

20. Você sente uma espécie de medo, como se alguma coisa ruim pudesse acontecer?

3  Sim, e de um Jeito muito forte

2  Sim, mas não tão forte

1  Um pouco. mas isso não me preocupa

0  Não sinto nada disso

21. Você da risada e se diverte quando vê coisas engraçadas?

0  Do mesmo jeito que antes

1  Atualmente um pouco menos

2  Atualmente bem menos

3  Não consigo mais

22. Você está com a cabeça cheia de preocupações?

3  A maior parte do tempo

2  Boa parte do tempo

1 ( ) De vez em quando

0 ( ) Raramente

23. Você se sente alegre?

3 ( ) Nunca

2 ( ) Poucas vezes

1 ( ) Muitas vezes

0 ( ) A maior parte do tempo

24. Você consegue ficar sentado à vontade e se sentir relaxado?

0 ( ) Sim, quase sempre

1 ( ) Muitas vezes

2 ( ) Poucas vezes

3 ( ) Nunca

25. Você sente que está lento(a) para pensar e fazer as coisas?

3 ( ) Quase sempre

2 ( ) Muitas vezes

1 ( ) De vez em quando

0 ( ) Nunca

26. Você tem uma sensação ruim de medo, como um frio na barriga ou um aperto no estômago?

0 ( ) Nunca

1 ( ) De vez em quando

2 ( ) Muitas vezes

3 ( ) Quase sempre

27. Você perdeu o interesse em cuidar da sua aparência?

3 ( ) Completamente

2 ( ) Não estou mais me cuidando como deveria

1 ( ) Talvez não tanto quanto antes

0 ( ) Me cuido do mesmo jeito que antes

28. Você se sente inquieto(a), como se não pudesse ficar parado(a) em lugar nenhum?

3 ( ) Sim, demais

2 ( ) Bastante

1 ( ) Um pouco

0 ( ) Não me sinto assim

29. Você fica esperando animado(a) as coisas boas que estão por vir?

0 ( ) Do mesmo jeito que antes

- 1 ( ) Um pouco menos do que antes
- 2 ( ) Bem menos do que antes
- 3 ( ) Quase nunca

30. De repente, você tem a sensação de entrar em pânico?

- 3 ( ) A quase todo momento
- 2 ( ) Várias vezes
- 1 ( ) De vez em quando
- 0 ( ) Não sinto isso

31. Você consegue sentir prazer quando assiste a um bom programa de televisão, de rádio ou quando lê alguma coisa?

- 0 ( ) Quase sempre
- 1 ( ) Várias vezes
- 2 ( ) Poucas vezes
- 3 ( ) Quase nunca

#### CÂNCER

32. Já teve algum tipo de câncer?

- ( ) sim ( ) não

Há quanto tempo?

33. Alguém da sua família já teve câncer?

- ( ) sim ( ) não

Quem: \_\_\_\_\_ Há quanto tempo? \_\_\_\_\_

Outras observações: \_\_\_\_\_

**APÊNDICE D – QUESTIONÁRIO PARA CONTROLES SAUDÁVEIS****QUESTIONÁRIO APLICADO AOS CONTROLES SAUDÁVEIS**

**1) Você tem ou já teve alguma doença hepática (no fígado)?**

- a. Não
- b. Sim ( ) hepatite viral (hepatite A, B ou C)
- ( ) esteatose hepática (gordura no fígado)
- ( ) cirrose
- ( ) outra: \_\_\_\_\_

**2) Você está tomando antibiótico ou teve infecção nos últimos 7 (sete) dias?**

- a. Não
- b. Sim

**3) Você está tomando medicamento imunossupressor? Ex: Azatioprina (Imuram), Tacrolimo (Prograf, Tarfic e Tacrofort), Ciclosporina (Sandimmun e Sigmasporim), Prednisona (Meticorten, Artinizona, Corticorten, Flamacorten, Predson, Prednax, Prednis, Predcort e Precortil), Micofenolato de sódio (Myfortic), Micofenolato mofetil (Cellcept), Everolimo (Certican), Sirolimo (Rapamune).**

- a. Não
- b. Sim

**4) Você tem diabetes?**

- a. Não
- b. Sim
- c. Não sei

**5) Você tem alguma doença autoimune ou doença inflamatória crônica? (ex: artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistêmico, doença celíaca, esclerose múltipla, doença de Crohn, asma e sinusite crônica)**

- a. Não

- b. Sim
- c. Não sei

**6) Você está se sentindo gripado/resfriado (a) ou com febre?**

- a. Não
- b. Sim

Fonte: autora e colaboradores (2018).

## ANEXO I – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SANTA CATARINA - UFSC



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Estudo de população exposta ocupacionalmente a agrotóxicos

**Pesquisador:** Cláudia Regina dos Santos

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 24590413.3.0000.0121

**Instituição Proponente:** UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

**Patrocinador Principal:** Universidade Federal de Santa Catarina

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 507.310

**Data da Relatoria:** 10/02/2014

#### Apresentação do Projeto:

A pesquisa intitulada „Estudo de população exposta ocupacionalmente a agrotóxicos” trata de um estudo de coorte retrospectiva onde serão avaliados 1% da população rural dos municípios de Águas Mornas, Antônio Carlos e Santo Amaro da Imperatriz (cerca de 120 indivíduos). Serão incluídos no grupo exposto, indivíduos com histórico de exposição à agrotóxicos como atividade laboral, nos últimos 20 anos. O grupo não exposto (proporção de 2:1), considerará indivíduos sem histórico de exposição ocupacional a agrotóxicos e pareados quanto a sexo, faixa etária e local de residência.

#### Objetivo da Pesquisa:

**Objetivo Primário:**

Avaliar indicadores biológicos de exposição, de efeito e de genotoxicidade e a hipótese de associações à alterações endócrinas, hematológicas, neurológicas e reumatológicas na população exposta ocupacionalmente a agrotóxicos da Grande Florianópolis.

**Objetivo Secundário:**

Validar métodos para a determinação dos indicadores biológicos de exposição para três agrotóxicos de acordo com a frequência de uso. Estimar a prevalência de alterações nos indicadores biológicos de efeito - atividade da colinesterase eritrocitária e plasmática. Estimar a prevalência de alterações nos indicadores de genotoxicidade - ensaio cometa e micronúcleos em

Endereço: Campus Universitário Reitor João David Ferreira Lima  
 Bairro: Litorânea CEP: 88.040-900  
 UF: SC Município: FLORIANO-POÍIS  
 Telefone: (48)3721-9206 Fax: (48)3721-9896 E-mail: cesp@reitoria.ufsc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SANTA CATARINA - UFSC



Continuação do Parecer: 537.310

linfócitos. Descrever as alterações endocrinológicas, hematológicas, neurológicas e reumatológicas na população de estudo. Estimar possíveis relações entre a exposição, os indicadores biológicos e as alterações clínicas encontradas na população de estudo.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**Riscos:**

Os riscos decorrentes da realização do presente estudo estão relacionados com a coleta das amostras biológicas (sangue) nos indivíduos. A coleta será realizada em local apropriado para esta finalidade e por profissional habilitado seguindo as recomendações das Boas Práticas Laboratoriais.

**Benefícios:**

- Detecção precoce de alteração clínico laboratorial relacionada a exposição ocupacional a agrotóxicos.- Encaminhamento para tratamento especializado em endocrinologia, hematologia e reumatologia no HU/UFSC caso haja detecção de anormalidades clínico laboratoriais.- Orientação/educação de novas práticas de trabalho com minimização de exposição ocupacional aos agentes.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A pesquisa apresenta pertinência, fundamentação bibliográfica, clareza em seus objetivos e uma vez obtido os dados conclusivos proporcionará a elaboração de novas práticas minimizando o efeito nocivo dos agrotóxicos e encaminhamento para tratamento especializado dos participantes da pesquisa caso se faça necessário.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Os documentos estão de acordo com o solicitado pelo CEPISH.

**Recomendações:**

Não se aplica.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Foram feitas todas as alterações no TCLE, não havendo inadequações, ou nada que venha impedir o prosseguimento da pesquisa.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

Endereço: Campus Universitário Ritor João David Ferreira Lima  
 Bairro: Litorânea CEP: 88.040-800  
 UF: SC Município: F. ORIANO-POLIS  
 Telefone: (48)3721-4906 Fax: (48)3721-4906 E-mail: cep@reitoria.ufsc.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SANTA CATARINA - UFSC



Continuação do Parecer 537.510

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

FLORIANOPOLIS, 07 de Janeiro de 2014

---

**Assinador por:**  
**Washington Portela de Souza**  
**(Coordenador)**

Endereço: Campus Universitário Rector João David Ferreira Lima  
Bairro: Litorâneo CEP: 88.040-800  
UF: SC Município: FLORIANÓPOLIS  
Telefone: (48)3721-4206 Fax: (48)3721-0896 E-mail: cep@reitoria.ufsc.br

## ANEXO II – PRODUÇÃO CIENTÍFICA

**Artigo publicado:** Jacobsen-Pereira CH, Cardoso CC, Gehlen TC, Regina Dos Santos C, Santos-Silva MC. Immune response of Brazilian farmers exposed to multiple pesticides. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2020 Oct 1;202:110912.

Ecotoxicology and Environmental Safety 202 (2020) 110912



Contents lists available at ScienceDirect

Ecotoxicology and Environmental Safety

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ecoenv](http://www.elsevier.com/locate/ecoenv)



## Immune response of Brazilian farmers exposed to multiple pesticides

Carolina Hilgert Jacobsen-Pereira<sup>a</sup>, Chandra Chiappin Cardoso<sup>a,b</sup>, Tais Cristina Gehlen<sup>c</sup>,  
Claudia Regina dos Santos<sup>c,d</sup>, Maria Claudia Santos-Silva<sup>b,d,\*</sup>

<sup>a</sup> Postgraduate Program in Pharmacy of the Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC, 88040-900, Brazil

<sup>b</sup> Division of Clinical Analysis, Flow Cytometry Service, University Hospital of the Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC, 88040-900, Brazil

<sup>c</sup> Laboratory of Toxicology, University Hospital of the Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC, 88040-900, Brazil

<sup>d</sup> Clinical Analysis Department, Health Sciences Center, Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC, 88040-900, Brazil

### ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Farmers  
Insecticides  
Purgicides  
Herbicides  
Immune cells  
Flow cytometry

### ABSTRACT

Occupational exposure to pesticides has been identified as a factor that predisposes to disorders of the immune system. Immunosuppression, autoimmunity, cancer of various organs and other diseases in people who apply these products have been reported by the studies. This study aimed to investigate the relationship between occupational exposure to pesticides and the immunological profile in 43 farmers exposed to mixtures of pesticides for at least 15 years. A control group composed of 30 individuals without a history of occupational exposure to pesticides was also evaluated. Peripheral blood samples were processed by flow cytometry and cells were labelled with an 8-color monoclonal antibody panel. Plasma cytokines were also measured. Significant increase in classical monocytes ( $p < 0.001$ ) and dendritic cells ( $p < 0.001$ ) in the exposed group was observed as well in total T cells ( $p = 0.04$ ), central memory CD8 T cells ( $p = 0.02$ ) and effector memory CD8 T cells ( $p = 0.01$ ). On the other hand, the activation markers of T cells as the expression of CD57, HLA-DR, CD25 and CD28 were evaluated and no difference was found between groups. When the B cells were analyzed, a significant decrease in total B cells ( $p = 0.01$ ), regulatory B cells ( $p < 0.001$ ) and plasmablasts ( $p < 0.001$ ) in the exposed group, compared to healthy controls, was observed. Pro-inflammatory IL-6 was significantly elevated ( $p = 0.04$ ) in the plasma of farmers compared to that of controls. The constant antigenic stimulus that occurs during exposure to pesticides can favor the recruitment of dendritic cells and macrophages (APCs) presents in the skin and respiratory tract. In the secondary lymphoid organs, the CD4 T and B cells that process such antigens are possibly undergoing proliferative exhaustion, with the consequent depletion of all mature B subpopulations. The resulting drop in humoral immunity may be offset by an increase in the number of circulating CD8 T lymphocytes due to their cytotoxic action.

### 1. Introduction

The immune system is composed of cells and tissues that communicate via cytokines and also through direct contact, resulting in a dynamic network specialized in specific types of responses. As in any complex system, the function of the immune system cannot be predicted from the behavior of any of its parts separately, as it is context dependent and involves hundreds of components (Furman and Davis, 2015). For more than a century, the immune system has been identified as a protective factor against infectious diseases. Current definitions are still largely influenced by these early observations, and the immune system is commonly presented as a defense mechanism composed of innate and

adaptive responses. However, host defense is only one face of the overall function of the immune system in maintaining tissue homeostasis and system integrity. In fact, the immune system is an integral part of fundamental physiological processes, such as development, reproduction and wound healing, and the proximity between the immune system and other body systems has been widely demonstrated (Julier et al., 2017; Negishi et al., 2018; Nelson and Lenz, 2017; Sattler, 2017).

Deficiencies in this complex machinery can disrupt the other systems. The clinical conditions presented depend on the specific type of underlying immune defect. Bacterial infections can manifest when defective B cells are present, whereas infections with several other pathogens (e.g. viruses, fungi and bacteria) characterize the combined

\* Corresponding author. Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Análises Clínicas, Campus Universitário, Florianópolis, SC, 88040-900, Brazil.  
E-mail address: [maria.claudia.silva@ufsc.br](mailto:maria.claudia.silva@ufsc.br) (M.C. Santos-Silva).

<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110912>

Received 2 March 2020; Received in revised form 13 June 2020; Accepted 16 June 2020

Available online 28 June 2020

0147-6513/© 2020 Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

**Artigo publicado (colaboração):** Cardoso CC, Matiollo C, Pereira CHJ, Fonseca JS, Alves HEL, da Silva OM, de Souza Menegassi V, Dos Santos CR, de Moraes ACR, de Lucca Schiavon L, Santos-Silva MC. Patterns of dendritic cell and monocyte subsets are associated with disease severity and mortality in liver cirrhosis patients. *Sci Rep.* 2021 Mar 15;11(1):5923.

www.nature.com/scientificreports

## scientific reports



OPEN

# Patterns of dendritic cell and monocyte subsets are associated with disease severity and mortality in liver cirrhosis patients

Chandra Chiappin Cardoso<sup>1,✉</sup>, Camila Matiollo<sup>3</sup>, Carolina Hilgert Jacobsen Pereira<sup>2</sup>, Janaina Santana Fonseca<sup>4</sup>, Helder Emmanuel Leite Alves<sup>5</sup>, Otavio Marcos da Silva<sup>4</sup>, Vivian de Souza Menegassi<sup>4</sup>, Claudia Regina dos Santos<sup>2,5</sup>, Ana Carolina Rabello de Moraes<sup>2,5</sup>, Leonardo de Lucca Schiavon<sup>1,4</sup> & Maria Claudia Santos-Silva<sup>1,2,✉</sup>

Liver cirrhosis is often complicated by an immunological imbalance known as cirrhosis-associated immune dysfunction. This study aimed to investigate disturbances in circulating monocytes and dendritic cells in patients with acute decompensation (AD) of cirrhosis. The sample included 39 adult cirrhotic patients hospitalized for AD, 29 patients with stable cirrhosis (SC), and 30 healthy controls (CTR). Flow cytometry was used to analyze monocyte and dendritic cell subsets in whole blood and quantify cytokines in plasma samples. Cirrhotic groups showed higher frequencies of intermediate monocytes (iMo) than CTR. AD patients had lower percentages of nonclassical monocytes than CTR and SC. Cirrhotic patients had a profound reduction in absolute and relative dendritic cell numbers compared with CTR and showed higher plasmacytoid/classical dendritic cell ratios. Increased plasma levels of IL-6, IL-10, and IL-17A, elevated percentages of CD62L<sup>+</sup> monocytes, and reduced HLA-DR expression on classical monocytes (cMo) were also observed in cirrhotic patients. Patients with more advanced liver disease showed increased cMo and reduced tissue macrophages (TiMas) frequencies. It was found that cMo percentages greater than 90.0% within the monocyte compartment and iMo and TiMas percentages lower than 5.7% and 8.6%, respectively, were associated with increased 90-day mortality. Monocytes and dendritic cells are deeply altered in cirrhotic patients, and subset profiles differ between stable and advanced liver disease. High cMo and low TiMas frequencies may be useful biomarkers of disease severity and mortality in liver cirrhosis.

### Abbreviations

DCs	Dendritic cells
cMo	Classical monocytes
iMo	Intermediate monocytes
ncMo	Nonclassical monocytes
TiMas	Tissular macrophages
Th	T helper
Tc	Cytotoxic T cells
cDCs	Classical DCs
pDCs	Plasmacytoid DCs
TLRs	Toll-like receptors

<sup>1</sup>Division of Clinical Analysis, Flow Cytometry Service, Health Sciences Center, University Hospital of the Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC 88040-900, Brazil. <sup>2</sup>Postgraduate Program in Pharmacy of the Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil. <sup>3</sup>Postgraduate Program in Medical Sciences of the Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil. <sup>4</sup>Division of Gastroenterology, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil. <sup>5</sup>Clinical Analysis Department, Health Sciences Center, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil. ✉email: chandraccardoso@gmail.com; maria.claudia.silva@ufsc.br

**Artigo publicado (colaboração):** Cardoso CC, Mاتيollo C, Pereira CHJ, Fonseca JS, Alves HEL, Silva OMD, Menegassi VS, Schiavon LL, Santos-Silva MC. B-cell compartment abnormalities are associated with ACLF and mortality in patients with liver cirrhosis. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2021 Jul;45(4):101698.

Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology 45 (2021) 101698



ELSEVIER

Available online at  
ScienceDirect  
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France  
EM|consulte  
www.em-consulte.com/en



ORIGINAL ARTICLE

## B-cell compartment abnormalities are associated with ACLF and mortality in patients with liver cirrhosis



Chandra Chiappin Cardoso<sup>a,b,\*</sup>, Camila Mاتيollo<sup>a,c</sup>,  
Carolina Hilgert Jacobsen Pereira<sup>b</sup>, Janaina Sant'ana Fonseca<sup>d</sup>,  
Helder Emmanuel Leite Alves<sup>d</sup>, Otavio Marcos da Silva<sup>d</sup>,  
Vivian de Souza Menegassi<sup>d</sup>, Leonardo de Lucca Schiavon<sup>c,d</sup>,  
Maria Claudia Santos-Silva<sup>a,b,e,\*</sup>

<sup>a</sup> Division of Clinical Analysis, Flow Cytometry Service, University Hospital of the Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

<sup>b</sup> Postgraduate Program in Pharmacy, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

<sup>c</sup> Postgraduate Program in Medical Sciences, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

<sup>d</sup> Division of Gastroenterology, University Hospital of the Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

<sup>e</sup> Department of Clinical Analysis, Health Sciences Center, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

Available online 20 April 2021

### KEYWORDS

B cells;  
Immune dysfunction;  
Liver cirrhosis;  
Flow cytometry

### Abstract

**Background:** Liver cirrhosis profoundly affects the immune system, leading to an immunological imbalance known as cirrhosis-associated immune dysfunction.

**Aims:** This study aimed to investigate B-cell disturbances in patients with acute decompensation (AD) of cirrhosis and assess relationships with prognosis and mortality.

**Methods:** The study included 39 patients with AD of cirrhosis, 29 patients with stable cirrhosis (SC), and 30 healthy controls (CTR). Circulating B-cell subsets and cytokine plasma levels were determined by flow cytometry.

Abbreviations: CAID, cirrhosis-associated immune dysfunction; GC, germinal centers; MBCs, memory B cells; NS, non-switched; CS, class-switched; AD, acute decompensation; SC, stable cirrhosis; PBMC, peripheral blood mononuclear cells; DN, double-negative B cells; AUROC, area under the receiver operating characteristic curve; HR, hazard ratio; CI, confidence interval; CVID, common variable immunodeficiency.

\* Corresponding authors at: Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Análises Clínicas, Campus Universitário, Florianópolis, SC 880-900, Brazil.

E-mail addresses: chandra.cardoso@ufsc.br (C.C. Cardoso), maria.claudia.silva@ufsc.br (M.C. Santos-Silva).

<https://doi.org/10.1016/j.clinre.2021.101698>  
2210-7401/© 2021 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

**Resumo apresentado em congresso (em colaboração):** Congresso da Sociedade Ibérica de Citometria (SIC), Salamanca, Espanha, 2019. Título de trabalho apresentado em forma de banner: Decreased Peripheral Dendritic Cells (DCs) in Decompensated Cirrhosis. Flow Cytometric Detection of DCs and its Relation to Disease Severity.



## Certificate of participation

We certify that

the paper entitled

Decreased peripheral dendritic cells (DCs) in decompensated cirrhosis. Flow cytometric detection of DCs and its relation to disease severity

has been presented by

Chandra Chiappin Cardoso  
 Carolina JH Pereira  
 Camila Matiollo  
 Janaina S Fonseca  
 Helder EL Alves  
 Otavio M Silva  
 Caudia R Dos Santos  
 Leonardo L Schiavon  
 Maria Claudia Santos-Silva

at the XVI Congress of the Iberian Society of Cytometry  
 held in Salamanca, Spain, 9-11 May 2019

Prof. Julia Almeida Parra  
 Chair of the Organising Committee

Prof. José Enrique O'connor Blasco  
 President of the Iberian Society of Cytometry (SIC)

**Resumo apresentado em congresso (em colaboração):** Congresso Brasileiro de Hepatologia (HEPATO) São Paulo, Brasil, 2019. Título de trabalho apresentado em forma de banner: Doença Hepática Avançada está Associada à Alteração nos Macrófagos Tissulares (TiMas) Circulantes.



Certificamos que o trabalho

**"DOENÇA HEPÁTICA AVANÇADA ESTÁ ASSOCIADA À ALTERAÇÃO NOS MACRÓFAGOS TISSULARES (TIMAS) CIRCULANTES"**

dos autores *CHANDRA CHIAPPIN CARDOSO; CAROLINA HILGERT JACOBSEN PEREIRA; CAMILA MATIOLLO; JANAÍNA S FONSECA; HELDER E L ALVES; OTAVIO M SILVA; VIVIAN S MENEGASSI; LEONARDO DE LUCCA SCHIAVON; MARIA CLAUDIA SANTOS-SILVA*

foi apresentado no formato **PÔSTER** durante o **XXV Congresso Brasileiro de Hepatologia**, realizado nos dias 2 a 4 de outubro de 2019, em São Paulo - SP.

São Paulo, 4 de outubro de 2019.

  
Dr. Paulo Lisboa Bitencourt  
Presidente da Sociedade Brasileira de Hepatologia

  
Dra. Maria Luiza Ferraz  
Secretária Geral da Sociedade Brasileira de Hepatologia

