



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

Melissa Mancini Alcantara

**Avaliação dos benefícios do extrato de semente de uva MASQUELIER® em
agricultores expostos à pesticidas no sul do Brasil**

Florianópolis

2023

Melissa Mancini Alcantara

**Avaliação dos benefícios do extrato de semente de uva MASQUELIER® em
agricultores expostos à pesticidas no sul do Brasil**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação
em Farmácia da Universidade Federal de Santa
Catarina como requisito parcial para a obtenção do
título de Doutora em Farmácia

Orientador: Prof. Dr. Sharbel Weidner Maluf

Florianópolis

2023

Este trabalho é dedicado aos meus filhos, Alice e Romeo,
a quem eu dedico todo o meu amor
e todas as minhas conquistas.

Melissa Mancini Alcantara

**Avaliação dos benefícios do extrato de semente de uva MASQUELIER® em
agricultores expostos à pesticidas no sul do Brasil**

O presente trabalho em nível de Doutorado foi avaliado e aprovado, em 30 de outubro de 2023, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. João Paulo Fernandes Teixeira, Dr.
Instituição Universidade do Porto

Prof. Marcos Antônio Segatto Silva, Dr.
Instituição Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Flávia Martinello, Dr.a
Instituição Universidade Federal de Santa Catarina

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. Sharbel Weidner Maluf, Dr.
Orientador(a)

Florianópolis, 2023

Alcantara, Melissa Mancini

Avaliação dos benefícios do extrato de semente de uva
MASQUELIER® em agricultores expostos à pesticidas no sul do Brasil
/ Melissa Mancini Alcantara ; orientador, Sharbel Weidner Maluf,
2023.

162 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina,
Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em
Farmácia, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Pesticidas. 3. Danos ao DNA. 4. Antioxidantes.
5. Extrato de semente de uva. I. Maluf, Sharbel Weidner. II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação
em Farmácia. III. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos agricultores que voluntariamente aceitaram participar desse estudo. Sem eles essa Tese não seria possível (e também não faria sentido).

Ao meu orientador, Dr. Sharbel, pela oportunidade, confiança, cumplicidade e amizade.

À empresa que forneceu o extrato de semente de uva, I.N.C. Agency B.V. I Masquelier's, e custeou alguns produtos e materiais necessários para o desenvolvimento desse projeto;

Aos meus pais, Antonio e Giamela, por tudo!

Ao meu marido Rafael, que há 20 anos faz parte da minha vida.

Aos integrantes e ex-integrantes do Laboratório de Citogenética e Estabilidade Genômica do HU. À Duda, que me levou ao Laboratório, e à partir de então eu consegui um projeto de Doutorado. À Nati, que me ajudou (e ajuda!) prontamente de todas as maneiras possíveis. À Natália, pela aplicação dos questionários e idas à Santo Amaro comigo; à Vitória, pelas eletroforeses; à Bruna, pelos experimentos, leituras de lâminas e sobretudo pelo comprometimento. Ao Gabriel da Microbiologia/ HU, pela dedicação, pelas idas à Santo Amaro, e pelas coletas de sangue.

Às Doutorandas e aos colaboradores dos outros laboratórios do HU e CCS – Carol, Laura, Lisandra, Liana, Janer, Adny, Julia – e seus orientadores, Dra. Fabiola, Dra. Tania Pasa e Dra. Maria Claudia, por todo o apoio e parceria na realização dos experimentos.

Ao professor Dr. Marcos Segatto, que me acolheu com tanto carinho quando resolvi retornar ao PGFAR, após tantos anos afastada. A maneira como fui recebida me incentivou em ir adiante.

À CAPES, pelo auxílio financeiro concedido através da Bolsa de Doutorado.

À UFSC e ao PGFAR, por fazerem parte de toda a minha formação acadêmica – Faculdade, Mestrado e Doutorado.

À tudo aquilo que deu certo na minha vida, e facilitou os meus caminhos.

À tudo aquilo que deu errado na minha vida: me fez mudar de rumo, e descobrir novas (e melhores!) possibilidades...

“Um sonho é apenas um sonho.
Um objetivo é um sonho com um plano e um prazo”.

Harvey Mackay

RESUMO

Os agrotóxicos são produtos químicos aplicados na agricultura para controlar ou eliminar todos os tipos de pragas. A população está exposta a esses xenobióticos tanto pela contaminação ambiental quanto pelo uso intencional, incluindo a exposição ocupacional. O objetivo deste estudo é avaliar os efeitos da administração do extrato de semente de uva MASQUELIER®, rico em proantocianidinas oligoméricas (OPCs), em marcadores de danos de DNA, marcadores imunológicos, marcadores toxicológicos, estresse oxidativo e expressão de microRNAs, em sangue periférico de agricultores expostos à pesticidas no sul do Brasil. O extrato de semente de uva utilizado como suplemento alimentar por agricultores expostos a agrotóxicos, na dosagem de 200 mg ao dia, por 8 semanas: reduziu alterações estruturais no DNA, bem como o índice de quebras de fitas simples com a enzima FPG no ensaio cometa, e quebras de fitas duplas no teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese celular, reduzindo a frequência de micronúcleos, pontes nucleoplasmáticas e apoptose; melhorou a atividade do sistema imunológico, aumentando células T CD4+ e a relação T CD4+ /T CD8+; reduziu a atividade da BuChE. Sendo assim, o extrato de semente de uva padronizado, na dosagem e no período de tempo utilizado, foi capaz de modular: danos oxidativos no DNA; parâmetros imunológicos; e parâmetros toxicológicos, mesmo em indivíduos sujeitos a exposição constante à pesticidas. Intervenções clínicas futuras poderiam avaliar dosagens e períodos de tempo maiores dessa suplementação em agricultores, a fim de avaliar outros marcadores de estresse oxidativo; reavaliar os parâmetros que não deram diferenças significativas, ou que deram diferenças conflitantes com o esperado nesse estudo.

Palavras-chave: pesticidas; agrotóxicos; danos ao DNA; estresse oxidativo; inflamação; antioxidantes; extrato de semente de uva.

ABSTRACT

Pesticides are chemicals applied in agriculture to control or eliminate all types of pests. The population is exposed to these xenobiotics both through environmental pollution and intentional use, including occupational exposure. The objective of this study is to evaluate the effects of administration of MASQUELIER[®], rich in oligomeric proanthocyanidins (OPCs), grape seed extract on markers of DNA damage, immunological parameters, toxicological markers, oxidative stress and expression of microRNAs, in peripheral blood of farmers exposed to pesticides in southern Brazil. Grape seed extract used as a dietary supplement by farmers exposed to pesticides, at a dosage of 200 mg per day, for 8 weeks: harmful structural changes in DNA, as well as the rate of single-strand breaks with the FPG enzyme in the comet assay, and double-strand breaks in the micronucleus test with blockage of cellular cytokinesis, decreasing the frequency of micronuclei, nucleoplasmic bridges and apoptosis; improved immune system activity, increasing CD4⁺ T cells and the CD4⁺ T/CD8⁺ T ratio; impairs BuChE activity. Therefore, the grape seed extract, in the dosage and period of time used, was able to modulate: oxidative damage to DNA; immunological parameters; and toxicological parameters, even in individuals subject to constant exposure to pesticides. Future clinical interventions could evaluate dosages and longer periods of time of this supplementation in farmers in order to evaluate other markers of oxidative stress; reevaluate the parameters that did not give significant differences, or that gave differences that conflict with what was expected in this study.

Keywords: pesticides; pesticides; DNA damage; oxidative stress; inflammation; antioxidants; grape seed extract.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Células submetidas ao ensaio Cometa coradas com solução de prata ..	50
Figura 2 – Alterações encontradas através da Técnica de Micronúcleos (CBMN) ...	53
Figura 3 – Estrutura molecular das proantocianidinas oligoméricas (OPCs)	64
Figura 4 – Principais atividades farmacológicas do extrato de semente de uva	68
Figura 5 - Técnica do Ensaio Cometa	73
Figura 6 - Técnica de Micronúcleo com Bloqueio de Citocinese Celular	78
Figura 7 - Células submetidas ao ensaio Cometa	94
Figura 8 - Ensaio Cometa. Frequência de dano total em 100 células /indivíduo	95
Figura 9 - Ensaio Cometa. Endonuclease total em 100 células /indivíduo	95
Figura 10 - Ensaio Cometa. FPG total em 100 células /indivíduo.....	95
Figura 11 - Ensaio Cometa. Tampão total em 100 células /indivíduo	96
Figura 12 – Alterações encontradas pela Técnica de micronúcleos	96
Figura 13 – Ensaio Micronúcleo com Bloqueio de Citocinese celular. Frequência de dano total em 500 células /indivíduo. Índice Mitótico	97
Figura 14 – Ensaio Micronúcleo com Bloqueio de Citocinese celular. Frequência de dano total em 500 células /indivíduo. Necrose	97
Figura 15 – Ensaio Micronúcleo com Bloqueio de Citocinese celular. Frequência de dano total em 500 células /indivíduo. Apoptose	97
Figura 16 – Ensaio Micronúcleo com Bloqueio de Citocinese celular. Frequência de dano total em 1000 células /indivíduo. Micronúcleos	97
Figura 17 – Ensaio Micronúcleo com Bloqueio de Citocinese celular. Frequência de dano total em 1000 células /indivíduo. Pontes nucleoplasmáticas	97
Figura 18 – Ensaio Micronúcleo com Bloqueio de Citocinese celular. Frequência de dano total em 1000 células /indivíduo. <i>Buds</i> nucleares	98
Figura 19 – Estresse oxidativo. GPx	98
Figura 20 – Alterações imunológicas. Células T CD4	98
Figura 21 – Alterações imunológicas. Relação Células T CD4 /T CD8	98
Figura 22 – Alterações imunológicas. Relação neutrófilos /linfócitos	98
Figura 23 – Alterações toxicológicas. Butirilcolinesterase	99
Figura 24 – Alterações toxicológicas. Acetilcolinesterase	99

Figura 25 – Coeficientes de correlação das variáveis analisadas no grupo extrato, antes da intervenção	119
Figura 26 – Correlações de variáveis analisadas no grupo extrato, depois da intervenção	120
Figura 27 – Análise de componentes principais dos dados de intensidade normalizada	121
Figura 28 – Perfil de expressão dos miRNAs diferencialmente expressos entre os controles e as amostras dos pacientes	124
Figura 29 – Expressão relativa do miR-21 (A-D) e miR-4516 (E-H) quando comparadas as amostras	125
Figura 30 – Expressão relativa do miR-223-3p e miR-451a quando comparadas as amostras	126

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Painel de anticorpos utilizado no estudo	82
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados referentes às coletas de sangue dos agricultores	85
Tabela 2 - Dados referentes ao perfil dos agricultores, divididos em grupos, de acordo com o sexo e a faixa etária	86
Tabela 3 - Tempo de exposição dos agricultores à agrotóxicos, de acordo com o sexo e a faixa etária	87
Tabela 4 - Exposição dos agricultores à agrotóxicos, de acordo com o sexo e a faixa etária	88
Tabela 5 - Uso de Equipamentos de Proteção Individual (EPIs), de acordo com o sexo e a faixa etária	88
Tabela 6 - Modo de aplicação dos agrotóxicos, de acordo com o sexo e a faixa etária	88
Tabela 7 - Cuidados após a aplicação de agrotóxicos, de acordo com o sexo e a faixa etária	89
Tabela 8 - Consumo de álcool e fumo, de acordo com o sexo e a faixa etária	90
Tabela 9 - Histórico clínico (pessoal e de familiares) - Doenças sistêmicas de perfil inflamatório e Doenças Neurológicas	91
Tabela 10 - Grupo Placebo (0) e Grupo Extrato (1)	93
Tabela 11 - Agricultores que tomaram o extrato, de acordo com o sexo e a faixa etária	94
Tabela 12 - Caracterização dos agricultores que tomaram o extrato, quanto a sua relação com os agrotóxicos, de acordo com o sexo e a faixa etária	95
Tabela 13 - Caracterização dos agricultores que tomaram o extrato, quanto aos seus hábitos, de acordo com o sexo e a faixa etária	95
Tabela 14 - Histórico clínico (pessoal e de familiares) - doenças sistêmicas de perfil inflamatório e doenças neurológicas dos agricultores que tomaram o extrato, de acordo com o sexo e a faixa etária	96
Tabela 15 - MiRNAs diferencialmente expressos na comparação das amostras controle x amostras de pacientes	110

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
AGEs	Produtos finais de glicação
AP-1	Proteína Ativadora 1
BER	Reparo por Excisão de Bases
BN	Binucleada
BuChE	Butirilcolinesterase
CAT	Catalase
CBMN	Técnica de Micronúcleo com Bloqueio de Citocinese Celular
DDR	Resposta ao Dano de DNA
DSB	Quebra de Fita Dupla de DNA
EPI	Equipamento de Proteção Individual
GPx	Glutathione Peroxidase
GSH	Glutathione
GSPE	Extrato de Semente de Uva Rico em Proantocianidinas
HR	Recombinação Homóloga
Hsp	Proteína de Choque Térmico
IL-1	Interleucina-1
IL-6	Interleucina-6
IMC	Índice de Massa Corporal
MAPK	Proteína Quinase Ativada por Mitógeno
MDA	Malondialdeído
MMR	Reparo de Incompatibilidades
MN	Micronúcleo
MPO	Mieloperoxidase
NAC	N-acetilcisteína
NBUDs	Brotos nucleares
NER	Reparo por Excisão de Nucleotídeos
NETs	Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos
NF-kB	Fator nuclear kappa B
NHEJ	Recombinação Não Homóloga
NO	Óxido Nítrico

NPnPs	Pontes nucleoplasmáticas
Nrf2	Fator Nuclear Eritroide 2
8-oxo-dG	8-hidroxi-2'-desoxiguanosina
OPCs	Proantocianidinas Oligoméricas
PARA	Programa de Análises de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos
PC	Proteína Carbonilada
PON1	Paraoxonase-1
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SASP	Fenótipo Secretor Associado à Senescência
SOD	Superóxido Dismutase
SSB	Quebra de Fita Simples de DNA
STAT3	Sinalização da Transcrição 3
SUS	Sistema Único de Saúde
TBARS	Ácido tiobarbitúrico
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TEAC	Capacidade Antioxidante Equivalente
TNF- α	Fator de necrose tumoral
UV	Ultravioleta
VO	Via Oral

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 OBJETIVOS	20
1.1.1 Objetivo geral	20
1.1.2 Objetivos específicos	20
2 DESENVOLVIMENTO	22
2.1 AGROTÓXICOS NO BRASIL.....	22
2.1.1 Mecanismos de ação dos agrotóxicos	24
2.2 EXPOSIÇÃO A AGROTÓXICOS	26
2.2.1 Exposição ocupacional a agrotóxicos	30
2.2.2 Estresse oxidativo por exposição ocupacional a agrotóxicos	32
2.2.3 Alterações imunológicas e imunofenotipagem por exposição ocupacional a agrotóxicos	36
2.3.4 ALTERAÇÕES TOXICOLÓGICAS POR EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL A AGROTÓXICOS	38
2.2.5 Danos ao DNA por exposição ocupacional a agrotóxicos	39
2.2.5.1 <i>Instabilidade genômica e danos ao DNA</i>	39
2.2.5.2 <i>Epigenética, danos ao DNA e pesticidas</i>	46
2.2.6 Marcadores de instabilidade genômica e danos ao DNA	48
2.2.6.1 <i>Ensaio cometa</i>	48
2.2.6.2 <i>Micronúcleos com bloqueio de citocinese celular (Cytome - CBMN)</i>	50
2.2.7 Instabilidade genômica e microRNAs	54
2.3 RADICAIS LIVRES.....	55
2.4 ANTIOXIDANTES	58
2.4.1 Antioxidantes e exposição a agrotóxicos	63
2.4.2 Extrato de semente de uva rico em proantocianidinas	64
2.4.2.1 <i>MASQUELIER® OPCs</i>	70
3 METODOLOGIA	72
3.1 ASPECTOS ÉTICOS.....	72
3.2 CASUÍSTICA.....	73
3.2.1 Desenho amostral	73
3.2.2 Crítérios de inclusão e exclusão; seleção de participantes	74
3.3 COLETAS, PROCESSAMENTO E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS	74

3.4 DANO DE DNA E AVALIAÇÃO DE INSTABILIDADE GENÔMICA - ENSAIO COMETA	75
3.4.1 Preparação das lâminas	75
3.4.1.1 <i>Lâminas sem enzimas</i>	75
3.4.1.2 <i>Lâminas com enzimas</i>	78
3.4.2 Eletroforese de célula única.....	78
3.4.3 Coloração das lâminas	79
3.4.4 Leitura das lâminas	79
3.5 DANO DE DNA E AVALIAÇÃO DE INSTABILIDADE GENÔMICA - TÉCNICA DE MICRONÚCLEO COM BLOQUEIO DE CITOCINESE CELULAR (CBMN)	80
3.5.1 Cultura celular	81
3.5.2 Preparação das lâminas	82
3.5.3 Leitura das lâminas	82
3.6 ESTRESSE OXIDATIVO.....	82
3.6.1 Imunoensaio enzimático.....	83
3.6.2 Ensaio colorimétrico	83
3.7 ALTERAÇÕES IMUNOLÓGICAS; IMUNOFENOTIPAGEM - ANÁLISE DA CELULARIDADE E PERFIL LEUCOCITÁRIO DO SANGUE PERIFÉRICO (SP).....	83
3.8 ALTERAÇÕES TOXICOLÓGICAS.....	84
3.9 ANÁLISE DE MICRO RNAS	85
3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	88
4 RESULTADOS.....	90
4.1 PERFIL DA POPULAÇÃO ESTUDADA	90
4.1.1 Dados das coletas e do perfil dos agricultores	90
4.2 DADOS CLÍNICOS.....	91
4.2.1 EXPOSIÇÃO À AGROTÓXICOS.....	91
4.2.1.1 <i>Classes de agrotóxicos utilizados e dados do plantio</i>	92
4.2.1.2 <i>Cuidados na aplicação, modo de aplicação e uso de equipamentos de proteção individual (EPIs).....</i>	93
4.2.2 Consumo de álcool e fumo.....	94
4.2.3 Histórico clínico (pessoal e de familiares): doenças sistêmicas de perfil inflamatório; doenças neurológicas	95
4.3 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....	96

4.4.1 DANO DE DNA: ENSAIO COMETA.....	104
4.4.2 DANO DE DNA: ENSAIO MICRONÚCLEO COM BLOQUEIO DE CITOCINESE CELULAR	108
4.4.3 ESTRESSE OXIDATIVO.....	115
4.4.4 ALTERAÇÕES IMUNOLÓGICAS E IMUNOFENOTIPAGEM	116
4.4.5 ALTERAÇÕES TOXICOLÓGICAS.....	119
4.4.6 CORRELAÇÕES: GRUPO EXTRATO → ANTES DO EXTRATO	121
4.4.7 CORRELAÇÕES: GRUPO EXTRATO → DEPOIS DO EXTRATO.....	123
5 DISCUSSÃO	130
6 CONCLUSÃO	138
REFERÊNCIAS	139
ANEXO A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)	150
Hospital Universitário – Unidade de Análises Clínicas.....	150
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	150
ANEXO B – QUESTIONÁRIO	152
ANEXO C – COMITÊ DE ÉTICA	161

1 INTRODUÇÃO

A economia brasileira tem como principal base a produção agrícola. As áreas agrícolas de maior destaque no Brasil estão nas regiões Sul, Nordeste e Centro-oeste. A contaminação por agrotóxicos nessas áreas ocorre por contato direto, pelo ar, pela água, pelo solo, e sobretudo pela sua manipulação e pelo descarte incorreto de seus resíduos (COSTA et al., 2021).

O Brasil é um dos países que mais utiliza agrotóxicos no mundo. Os pesticidas são classificados pela Agência Internacional de Pesquisa do Câncer (IARC, 2014), como Carcinógenos Humanos Conhecidos (Grupo 1A) e Prováveis (Grupo 2A). São ainda associados à alterações cromossômicas, estresse oxidativo, doenças cardiovasculares, condições neurodegenerativas, distúrbios reprodutivos (COSTA et al., 2021).

O reparo do DNA sujeito à erros é considerado um fator de risco para vários tipos de câncer; lesões genéticas estão associadas ao desenvolvimento da carcinogênese (COSTA et al., 2021; SCHUMACHER et al., 2021). Danos ao DNA (tanto o nuclear quanto o mitocondrial, em fita simples ou fitas duplas) podem resultar da exposição a agentes exógenos, como por exemplo, xenobióticos no ar, na água, em alimentos e radiação ultravioleta (UV); ou ainda por fontes endógenas, como as espécies reativas de oxigênio (ROS) e produtos finais de glicação (AGEs) (SCHUMACHER et al., 2021).

As consequências moleculares de danos acumulados no DNA são tempo-dependentes e exposição-dependentes. Podem ocorrer: aberrações genéticas, como mutações e instabilidade genômica; paralisação de RNA e DNA polimerases por lesões de DNA, provocando sinalização de dano ao DNA e interferindo nas suas funções primárias. Encurtamento de telômeros, alterações epigenéticas, estresse proteostático e comprometimento de função mitocondrial (SCHUMACHER et al., 2021).

As consequências celulares e teciduais de danos ao DNA e resposta ao dano de DNA (DDR) incluem decisões sobre o destino celular, como senescência, morte celular ou esgotamento de células-tronco (SCHUMACHER et al., 2021).

As consequências sistêmicas ocorrem por meio de sinalização endócrina, respostas inflamatórias e alterações metabólicas. Desregulação da sinalização e comunicação celular, podendo levar à perda funcional de tecidos e órgãos;

desregulação em mecanismos de detecção de nutrientes, além de inflamação e doenças, como o câncer (SCHUMACHER et al., 2021). Já que, conforme mencionado, lesões de DNA são exposição e tempo-dependentes, inevitavelmente se acumulam; isso faz com que a instabilidade do genoma esteja intimamente relacionada ao envelhecimento e às doenças relacionadas ao envelhecimento (SCHUMACHER et al., 2021).

Intervenções dietéticas (bem como diversas outras medidas, como: proteção contra radiação UV; evitar o tabagismo; redução do nível de estresse; boa qualidade de sono; menor exposição à xenobióticos), são algumas das maneiras de reduzir o impacto da exposição à agentes exógenos, modulando ainda alguns dos processos endógenos.

Sendo assim, intervenções que visam reduzir danos ao DNA e aumentar a sua capacidade de reparo, aumentam a saúde e a qualidade de vida. Reduzem ainda o risco de doenças, como o câncer.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos da administração do extrato de semente de uva MASQUELIER® OPCs em marcadores de danos de DNA, marcadores imunológicos e toxicológicos, estresse oxidativo e expressão de microRNAs, em sangue periférico de agricultores expostos à pesticidas no Sul do Brasil.

1.1.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar o perfil de microRNAs em agricultores expostos a pesticidas, antes e depois da utilização do extrato de semente de uva MASQUELIER® OPCs, como agente antioxidante;
- b) Avaliar os índices de quebras de fita simples, quebras de fita dupla e de alterações estruturais sensíveis ao pH alcalino das fitas de DNA, obtidos a partir do ensaio cometa e comparar entre antes e depois da administração do extrato;

- c) Avaliar as frequências de micronúcleos, pontes nucleoplasmáticas, brotos (*buds*) nucleares, células apoptóticas, células necróticas e o índice de divisão nuclear, obtidas a partir da técnica de micronúcleos com o bloqueio da citocinese celular, e comparar entre antes e depois da administração do extrato;
- d) Avaliar os níveis de estresse oxidativo através da avaliação de marcadores, como a Glutathione Peroxidase (GPx), através de ELISA, em agricultores expostos à pesticidas, antes e depois da utilização do extrato de semente de uva, como agente antioxidante;
- e) Avaliar os parâmetros toxicológicos: colinesterase (através do ensaio colorimétrico automatizado), em agricultores expostos à pesticidas, antes e depois da utilização do extrato de semente de uva;
- f) Avaliar parâmetros imunológicos e determinar os valores relativos e absolutos de linfócitos T ou suas subpopulações (T CD4+) e a relação T CD4+ / T CD8+, e comparar entre antes e depois da administração do extrato.

2 DESENVOLVIMENTO

Para realização da revisão bibliográfica foram utilizadas as bases de dados online PubMed e Scielo, além de livros e periódicos. Os principais assuntos pesquisados foram: dano de DNA; pesticidas; instabilidade genômica; antioxidantes; extrato de semente de uva; *Vitis vinífera*, L.

2.1 AGROTÓXICOS NO BRASIL

Os agrotóxicos são produtos químicos e naturais de aplicados na agricultura para controlar ou eliminar todos os tipos de pragas: insetos; pássaros; ou microrganismos (que causam doenças em plantas) e plantas daninhas. A população está exposta aos agrotóxicos tanto pela contaminação ambiental quanto pelo uso intencional. Estima-se que cada brasileiro consuma em média sete litros de agrotóxicos por ano; está diretamente relacionado às 70 mil intoxicações agudas e crônicas, segundo dados do dossiê elaborado pela Associação Brasileira de Saúde Pública (ABRASCO). A exposição aos agrotóxicos pode ser ocupacional ou ocasional; ocorre por ingestão, inalação ou contato com a pele (geralmente relacionada ao manuseio desses produtos) (PANIS et al., 2022).

No ano de 2015, o Brasil plantou mais de 70 milhões de hectares de lavouras, com predomínio de soja (42 % de toda área plantada do país), milho (com 21 % de área plantada) e cana-de-açúcar (13 % de área plantada no Brasil). Dessa forma, esses cultivos foram os que mais consumiram agrotóxicos. Em Santa Catarina, nesse mesmo período, os cultivos que mais consumiram agrotóxicos foram: soja (38 %), milho (25 %), arroz (9 %), fumo (7 %), feijão (5 %), trigo (5 %), banana (2 %) e cana-de-açúcar (1 %) (PIGNATI et al., 2017).

O agronegócio é considerado uma das atividades mais importantes da economia brasileira. As estimativas de produção de grãos do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA (2020) apontam para uma safra 2019 /2020 de 250,9 milhões de toneladas, em uma área plantada de 65,5 milhões de hectares. De acordo com os dados mais recentes do Censo Agropecuário, apenas três produtos são responsáveis por 85 % da área colhida a partir dos produtos das culturas anuais: 1) soja (30,4 milhões de hectares em 2017); 2) milho (16,3 milhões de hectares); e 3) cana-de-açúcar (9,1 milhões de hectares) (PANIS et al., 2022).

A alta produção de soja, milho e cana-de-açúcar se reflete na posição de destaque que o Brasil ocupa tanto na produção quanto na exportação de produtos agrícolas. O país ocupa o primeiro lugar nas exportações de soja e açúcar; o Brasil comercializa seus produtos para 43 destinos no caso da soja, e 113 destinos no caso do açúcar. O Brasil também é o segundo maior exportador de milho do mundo (destinando sua produção à 68 destinos). China e Estados Unidos são os principais destinos dos produtos do agronegócio brasileiro (PANIS et al., 2022).

Estima-se que no ano de 2015, foi pulverizado quase 900 milhões de litros de agrotóxicos em lavouras brasileiras, distribuídos por diversos cultivos (apresentados à seguir em ordem decrescente em relação ao consumo de agrotóxicos): soja, milho, cana-de-açúcar, algodão, trigo, fumo, arroz, café, cítricos, feijão, banana, tomate, uva, girassol, mamão, melancia, abacaxi, manga e melão (PIGNATI et al., 2017).

Considerando a área plantada (hectares) dos cultivos analisados, seus respectivos consumos de agrotóxicos e predominância de lavoura agrícola por Unidade Federada no país, em 2015 os 10 estados que mais consumiram agrotóxicos, em ordem decrescente, foram: Mato Grosso, Paraná, Rio Grande do Sul, São Paulo, Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Bahia, Maranhão e Santa Catarina (PIGNATI et al., 2017).

Em 2019, o país foi dividido em 5 grandes classes em relação às toneladas de agrotóxicos comercializados (PANIS et al., 2022):

- 1) Mato Grosso (MT - foi o maior, atingindo 121.473 toneladas); seguido por São Paulo (SP - 92.514 toneladas); Rio Grande do Sul (RS - 74.291 toneladas); e Paraná (PR - 63.714 toneladas);
- 2) Goiás (GO - 49.449 toneladas); e Minas Gerais (MG - 44.200 toneladas);
- 3) Mato Grosso do Sul (MS - 38.186 toneladas); e Bahia (BA - 30.990 toneladas);
- 4) Santa Catarina (SC - 12.442 toneladas); e Maranhão (MA - 10.581 toneladas);
- 5) Os demais estados brasileiros, que usaram menos de 10.000 toneladas de agrotóxicos em 2019.

Dessa forma, o Estado de Santa Catarina ocupa agora a nona posição em relação às toneladas de agrotóxicos comercializados (PANIS et al., 2022).

No Brasil, a quantidade de intoxicações por agrotóxicos aumentou mais rapidamente do que a quantidade de área plantada; a taxa nacional de crescimento

das intoxicações foi de 8 % entre 2007 e 2017, superior ao crescimento médio da área colhida que foi de 2 % no mesmo período (NASCIMENTO et al., 2020).

2.1.1 Mecanismos de ação dos agrotóxicos

Os agrotóxicos incluem um grande número de moléculas químicas, com diferentes modos de ação e toxicidade, sendo divididos em três grandes classes: inseticidas, fungicidas e herbicidas (CASIDA; DURKIN, 2017; PANIS et al., 2022).

No entanto, ainda existem acaricidas, moluscicidas, rodenticidas, entre outros. Herbicidas são substâncias químicas que reduzem ou eliminam as plantas (popularmente conhecidas como plantas daninhas), ou seja, aquelas que competem por água e nutrientes com a planta cultivada. Atualmente, os herbicidas lideram a lista dos princípios ativos mais comercializados, com um crescimento de venda de 126,5 % entre 2009 e 2019. Os fungicidas são substâncias químicas aplicadas em plantas cultivadas para matar fungos ou prevenir o aparecimento de doenças fúngicas. As vendas de fungicidas aumentaram 100 % de 2009 a 2019. Os inseticidas são produtos à base de substâncias de ação direta ou indireta que causam a morte de insetos. Entre 2009 e 2019, o maior crescimento no volume vendido foi entre os inseticidas (259,6 %). Os inseticidas/acaricidas cresceram 14,3 %. As vendas de adjuvantes cresceram 21,8 % e as de outros produtos agrotóxicos, 98,9 % (PANIS et al., 2022).

Os inseticidas atuam sobretudo no receptor nicotínico de acetilcolina; os herbicidas (como o glifosato), inibem a biossíntese de aminoácidos aromáticos; os fungicidas inibem sítios do citocromo P450 (CASIDA; DURKIN, 2017).

Os inseticidas são compostos organofosforados que têm como principal alvo de inibição a acetilcolinesterase (AChE). A acetilcolina (ACh) é um importante neurotransmissor que deve ser hidrolisado em colina e ácido acético para restaurar neurônios colinérgicos ativados; AChE e butirilcolinesterase (BuChE) são as enzimas que hidrolisam esse processo catalítico. A AChE atua na terminação dos impulsos nervosos; tem sido muito estudada pela sua associação com doenças neurodegenerativas (como a doença de Alzheimer, onde há baixos níveis de ACh) (THAPA et al., 2017).

Os pesticidas mais comumente aplicados são os organofosforados e os carbamatos, que inibem as enzimas colinesterases, impactando vários sistemas orgânicos, como o sistema nervoso, músculo-esquelético, respiratório e circulatório. O

mecanismo da inibição envolve a fosforilação de um grupo hidroxila no aminoácido serina no sítio ativo da enzima. A AChE é uma enzima que degrada a acetilcolina, além de atuar como um neurotransmissor. Dos dois principais receptores de acetilcolina - nicotínicos e muscarínicos -, a AChE tem maior afinidade pelos receptores muscarínicos; a inibição da AChE causa o acúmulo de acetilcolina, levando à superestimulação do cérebro (predominantemente nos locais dos receptores muscarínicos) (PARRA-ARROYO et al., 2022).

Os herbicidas (como o glifosato), atuam inibindo a enzima 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS), interrompendo portanto, a produção de aminoácidos aromáticos e compostos secundários com funções de defesa em plantas e em muitos microorganismos. Eles se acumulam por toda a planta (incluindo suas raízes e sementes). Tanto o glifosato quanto o seu produto de degradação (o Ácido Amino-Metil Fosfônico, ou AMPA) inibem a atividade de enzimas antioxidantes e induzem o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS), que induzem disfunção fisiológica e dano celular (VAN BRUGGEN et al., 2018).

Os fungicidas azólicos (sobretudo os triazóis), atuam na inibição da enzima 14- α -esterol desmetilase, que pertence à família do citocromo P450 (CYP), também conhecida como CYP51. A inibição desta enzima leva à depleção de ergosterol em fungos (e a integridade da membrana da célula fúngica é interrompida). Essa inibição interfere com diferentes receptores nucleares ativados por ligante, além de alterações subsequentes na expressão de genes-alvo de receptores nucleares correspondentes (como por exemplo, várias enzimas CYP que têm um papel importante no metabolismo xenobiótico) (MARX-STOELTING et al., 2020).

Com base em sua estrutura química, existem cinco classes principais de pesticidas: organoclorados; organofosfatos; carbamatos; piretroides; triazinas (YILMAZ et al., 2020).

Os agrotóxicos com ação herbicida mais vendidos no Brasil em 2019, foram Glifosato e seus sais (2,4-D, Atrazina e Paraquat). Este ingrediente ativo teve sua comercialização proibida no Brasil a partir de 22 de setembro de 2020, devido à reavaliação toxicológica conforme previsto na Resolução RDC nº 177, de 21 de setembro de 2017, publicada no Diário Oficial de 22 de setembro de 2017. No entanto, pode ser utilizado por produtores que haviam estocado o produto até 31 de agosto de 2021. Entre os inseticidas estão Acefato, Melationa e Clorpirifós. E, entre os fungicidas, estão Mancozebe e Clorotalonil (PANIS et al., 2022).

O processo de desintoxicação, ou seja, transformar e eliminar o composto químico do organismo, divide-se em 3 fases (GENUIS; KYRILLOS, 2017):

1) Bioativação – o hidrocarboneto lipofílico é modificado por reações de oxidação, redução ou hidrólise. Incorpora átomos ou grupos nucleofílicos ou eletrofílicos (OH-, O-, N-, S-) que servirão como pontos de ligação em outras reações de polarização através da conjugação. Essa fase é composta por citocromo P450 e enzimas reguladas por receptores nucleares (vulneráveis à ações xenobióticas);

2) Conjugação – outros grupos (como aminoácidos ácidos) são adicionados através de ligações covalentes, transformando o xenobiótico numa molécula mais polar, mais adequado para extração através de transportadores de membrana celular. Envolve enzimas como metil-, sulfo-, e glucuronosil- transferases, além de glutathione-S transferase; as reações permanecem intracelulares. Esses agentes tóxicos conjugados são então liberados no meio onde são mais facilmente eliminados do corpo; também podem ser submetidos à transformação adicional na fase 3;

3) Eliminação – envolve a família ATP-binding, de transformação de drogas. Tais transportadores estão implicados na resistência à drogas, e considerados um “incômodo” para a atividade droga-alvo (como por exemplo, antibióticos, quimioterapia). Já no caso de poluentes químicos, são excelentes mecanismos de eliminação. Contudo, alguns organoclorados e seus metabólitos impedem a atividade dessa via de desintoxicação, favorecendo a bioacumulação desses agentes, uma vez que também interferem na atividade do citocromo P450.

O principal local de desintoxicação é o retículo endoplasmático do fígado, mas diversos outros tecidos (incluindo rins, pele, cérebro, pulmões, coração, testículos, placenta), também participam desse processo (GENUIS; KYRILLOS, 2017).

2.2 EXPOSIÇÃO A AGROTÓXICOS

A população está exposta através do ar, da água, dos alimentos e do solo (GENUIS; KYRILLOS, 2017).

No meio ambiente, o alto uso de agrotóxicos causa degradação do solo e da água, além da contaminação de organismos aquáticos e terrestres. Ultimamente a alta letalidade de abelhas também tem sido relacionada ao uso extenso de pesticidas (LOPES; ALBUQUERQUE, 2021).

Esses poluentes químicos persistem no corpo humano por longos períodos de tempo principalmente por: reabsorção contínua na circulação entero-hepática; capacidade limitada de desintoxicação; afinidade seletiva de alguns produtos químicos em locais específicos de retenção (como o cérebro), ou tecido adiposo (no caso de compostos lipofílicos) (GENUIS; KYRILLOS, 2017).

A toxicidade celular tem como consequência, diversas alterações fisiopatológicas que podem ocorrer. Danos ao DNA podem, por exemplo, induzir disfunção endócrina; estresse oxidativo pode induzir inflamação crônica e doenças de perfil inflamatório; modificações epigenéticas podem favorecer desregulação de vias / sinalizações celulares (GENUIS; KYRILLOS, 2017).

A exposição a substâncias químicas (agrotóxicos) em regiões de média e alta produção agrícola tem sido apontada como potenciais fatores causais de cânceres; a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC/OMS) tem classificado agrotóxicos frequentemente utilizados nas lavouras como potencialmente cancerígenos, como por exemplo, o glifosato (GUYTON et al., 2015).

De acordo com a classificação da IARC, um pesticida é classificado no Grupo 1 se for cancerígeno para humanos; no Grupo 2A, se é provavelmente cancerígeno para humanos (quando há evidência limitada de carcinogenicidade em humanos e evidência suficiente de carcinogenicidade em animais de teste); no Grupo 2B, se for possivelmente carcinogênico para humanos (por exemplo, evidência limitada de carcinogenicidade em humanos e evidência insuficiente em animais de teste); no Grupo 3, se não for classificável quanto à carcinogenicidade em humanos (evidência inadequada de carcinogenicidade em humanos e evidência inadequada ou limitada em animais de experimentação); e no grupo 4, se provavelmente não for cancerígeno para humanos (IARC, 2014).

De acordo com uma revisão sistemática sobre o impacto dos agrotóxicos no meio ambiente e na saúde humana, a exposição está associada à suicídio, depressão, ansiedade, distúrbios respiratórios, óbitos fetais, alterações hepáticas e hormonais, linfoma não Hodgkin, alterações em sistemas reprodutores femininos e masculinos, perdas auditivas e danos em mecanismos de defesa celular (LOPES; ALBUQUERQUE, 2018).

São considerados desreguladores endócrinos: agentes exógenos que interferem na síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação de hormônios naturais no corpo, responsáveis por manutenção da homeostase, reprodução,

desenvolvimento e/ou comportamento. Sobretudo os pesticidas organoclorados, pela sua característica lipofílica, e portanto, capacidade de bioacumulação; são poluentes orgânicos e ambientais persistentes (YILMAZ et al., 2020).

A exposição primária ocorre muitas vezes pela ingestão de alimentos, além de outras vias, como inalação e absorção cutânea (YILMAZ et al., 2020).

A composição nutricional dos alimentos contaminados por agrotóxicos pode inclusive ser alterada, podendo por exemplo, reduzir a quantidade de antioxidantes presentes (LIMA et al., 2012).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) implantou desde 2001, o Programa de Análises de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA). Com o apoio das equipes de Vigilância Sanitária municipais e estaduais, o PARA coleta periodicamente, alimentos expostos à venda em redes de supermercados distribuídos nos municípios do país; o objetivo é que sejam analisados nos laboratórios públicos e privados contratados. Essa análise identifica os tipos de agrotóxicos presentes nos alimentos, com base no método de multi-resíduos e outros métodos específicos para algumas substâncias; verifica se são autorizados para aquela cultura e se estão dentro do limite máximo de resíduos (LMR) permitido pela ANVISA (ANVISA, 2021).

De acordo com os resultados do PARA, entre os anos de 2001 e 2015, foram analisados 25 tipos de alimentos e mais de 30 mil amostras. Porém, o máximo de ingredientes analisados foi 228. Além disso, a presença de ingredientes ativos não autorizados no país foi a principal causa de irregularidades em alimentos (LOPES; ALBUQUERQUE, 2021).

Contudo, devido à pandemia da Covid-19, o PARA sofreu suspensão temporária de coletas no dia 06/08/2020, devendo ser mantida até haver condições adequadas para a retomada das atividades (ANVISA, 2021). Infelizmente, isso ocorreu justamente no período em que o PARA precisaria estar ainda mais fortalecido, uma vez que o governo federal naquele período, demonstrava maior flexibilização no uso de agrotóxicos.

Em 19/09/2022 foram retomadas as coletas do PARA; a última atualização da ANVISA sobre os resíduos de agrotóxicos presentes em alimentos foi feita em 03/11/2022. Nesse relatório foram analisados pouco mais de 12 mil amostras nos 27 estados brasileiros, além do Distrito Federal; a novidade é que pela primeira vez o documento revelou o risco dos resíduos para a saúde, como é feito em outras partes do mundo (ANVISA, 2023).

As irregularidades encontradas não representaram riscos agudos à saúde do consumidor. Mas o relatório alerta para o aumento de riscos ao agricultor, caso ele utilize agrotóxicos em desacordo com as recomendações de uso autorizadas: uso excessivo do produto; colheita do alimento antes do período de carência descrito na bula do pesticida (ANVISA, 2023).

A contaminação cruzada e de solo também podem ocasionar a presença de resíduos irregulares em alimentos. A laranja foi um dos alimentos de maior quantidade de amostras analisadas; a extensa maioria das amostras foi considerada satisfatória, ou sem resíduos. Contudo, o agrotóxico carbofurano (que passa por um processo de reavaliação de riscos na ANVISA), foi encontrado em algumas amostras dessa fruta. Já o abacaxi, apresentou o agrotóxico carbendazim em algumas de suas amostras. O PARA destaca que analisa o alimento inteiro, e como tanto a laranja quanto o abacaxi são descascados para consumo, a possibilidade de risco de contaminação fica bastante diminuída. No caso de produtos como a abobrinha, o tomate, o pimentão e o morango, o risco agudo calculado foi considerado aceitável em quantidade superior a 99 % das amostras analisadas (ANVISA, 2023).

A *International Cancer Research Agency* alerta sobre o potencial dos agrotóxicos em causar câncer. Alerta ainda que alguns agrotóxicos classificados como poluentes orgânicos persistentes (como DDT) e outros atualmente em uso (como glifosato) representam uma ameaça para a população exposta, uma vez que são classificados como provavelmente ou possivelmente cancerígenos. Esse mesmo órgão relaciona a exposição à agrotóxicos à vários distúrbios de saúde: distúrbios respiratórios e reprodutivos, disfunção endócrina, linfomas Hodgkin e não Hodgkin, doença de Parkinson e vários tipos de tumores, como mama, cérebro e próstata, pulmão, fígado, tecido linfóide, útero e tireóide. No Brasil, a maioria tem sido associada a intoxicações agudas e crônicas por exposição repetitiva à substâncias muito tóxicas, como organofosforados e carbamatos. A *International Cancer Research Agency* reforça a necessidade de compreender o quadro de agrotóxicos e problemas de saúde no Brasil (PANIS et al., 2022).

Conforme estabelecido no Decreto 4.074 /2002, o IBAMA é o órgão responsável por “realizar a avaliação ambiental de agrotóxicos, seus componentes e afins, estabelecendo suas classificações quanto ao potencial de risco ambiental”. Essa avaliação é baseada nas características do produto, como as propriedades físico-químicas e sua toxicidade para organismos encontrados na

natureza, quanto o produto se acumula nos tecidos vivos, se persiste por muito tempo no meio ambiente, se pode se mover o solo, ar ou água, e os perigos de causar mutações, câncer, entre outras doenças, bem como o risco de comprometer a reprodução de aves e mamíferos. Assim, são divididos em: Classe I - Produto Altamente Perigoso ao Meio Ambiente; Classe II - Produto Muito Perigoso ao Meio Ambiente; Classe III - Produto Perigoso ao Meio Ambiente; e Classe IV - Produto Pouco Perigoso ao Meio Ambiente. Todos os agrotóxicos registrados no Brasil possuem uma dessas classificações de perigo ambiental e essa informação encontra-se nas instruções do produto (PANIS et al., 2022).

Os agrotóxicos pertencentes à Classe III são os mais vendidos no país (já que os princípios ativos mais comercializados, como Glifosato e 2,4-D pertencem à Classe III). Em segundo lugar, há produtos classificados na Classe II (como Atrazina, Mancozebe, Acefato, Clorotalonil e Malathione, que pertencem à esse grupo). Em terceiro lugar, vêm os produtos Classe IV e, em quarto lugar, os produtos Classe I. Houve um aumento significativo na venda de agrotóxicos classificados como os mais perigosos para o meio ambiente, e uma redução, nos últimos 2 anos, de produtos pertencentes à Classe IV, considerados pouco perigosos. Assim, percebe-se atualmente uma tendência no uso de agrotóxicos mais nocivos aos solos e recursos hídricos, bem como aos seres vivos que estão expostos à esses agentes (PANIS et al., 2022).

2.2.1 Exposição ocupacional a agrotóxicos

Existem programas sociais e regulamentações que visam a saúde do trabalhador rural: ações educativas; boas práticas agrícolas; uso de equipamentos de proteção individual (EPIs) (SELMÍ; TRAPÉ, 2014).

A maioria das iniciativas de saúde no Brasil está vinculada ao Sistema Único de Saúde (SUS), que fiscaliza e regulamenta essas práticas por meio de portarias e políticas públicas. As questões relacionadas à saúde ocupacional são pautadas pela Política Nacional de Saúde do Trabalhador, instituída pela Portaria nº 1.823, de 23 de agosto de 2012 (BRASIL, 2012).

A vigilância em saúde ocupacional permite conhecer o ambiente de trabalho e os fatores de risco na qual o trabalhador está exposto em sua atividade

profissional. Essas observações visam melhorias na saúde e segurança (de-ASSIS et al., 2021).

O desenvolvimento de novos pesticidas, com novos mecanismos de ação, perfis de segurança aprimorados, bem como a implementação de sistemas de cultivo alternativos (menos dependentes de pesticidas), poderiam minimizar a sua exposição (sobretudo ocupacional) e os efeitos indesejáveis na saúde humana. Além disso, o uso de equipamento de pulverização adequado e bem conservado, juntamente com a tomada de todas as precauções necessárias em todas as etapas do seu manuseio, também poderia reduzir o impacto da sua exposição. Quando administrado, deveriam ser tomados maiores cuidados em relação à sua exposição em alimentos e água potável. A associação desses fatores poderia contribuir para a redução dos efeitos adversos dos agrotóxicos na saúde humana e no meio ambiente (DAMALAS et al., 2011).

Contudo, o que acontece vai de encontro à esses fatores, contribuindo para a toxicidade aguda e crônica por exposição à pesticidas. Ainda se tem poucos estudos que investiguem o uso de alternativas químicas menos perigosas no controle de pragas e ervas daninhas, assim como pouco investimento na saúde do meio ambiente e dos trabalhadores agrícolas (de-ASSIS et al., 2021).

A subestimação dos seus riscos têm agravado e impactado a saúde dos agricultores: falta de treinamento e conhecimento sobre o uso correto dos agrotóxicos; incapacidade de compreender os rótulos dos produtos (linguagem difícil aliada à baixa escolaridade dos trabalhadores); condições de armazenamento inadequadas, muitas vezes aliado ainda à reutilização de embalagens vazias (inclusive para armazenagem de água e alimentos para consumo); não lavagem de mãos após o manuseio; uso não rotineiro de EPIs; altos custos de equipamentos especializados (de-ASSIS et al., 2021).

Alguns países, como o Brasil, negligenciam as intoxicações e as consequências causadas pelos pesticidas. Os altos níveis de toxicidade associados à ausência de restrições favorecem a alta taxa de doenças relacionadas à agrotóxicos em trabalhadores rurais. Esses países se caracterizam pela utilização de misturas de agrotóxicos para aumento da eficácia do produto químico, aliado à intensificação do seu uso, agravando suas consequências. Países desenvolvidos possuem políticas de restrição mais adequadas (NASCIMENTO et al., 2021).

2.2.2 Estresse oxidativo por exposição ocupacional a agrotóxicos

O estresse oxidativo resulta de um desequilíbrio entre os radicais livres / espécies reativas de oxigênio (ROS) e antioxidantes. Quando esse desequilíbrio favorece aos ROS em relação aos antioxidantes pode ocorrer dano oxidativo, resultando em adaptação celular, dano a lipídios, carboidratos e proteínas celulares, dano ao DNA e / ou morte celular (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004; BIRBEN et al., 2012; FRIJHOFF et al., 2015).

A maior parte dos radicais livres que causam danos às estruturas biológicas (ou seja, biomoléculas como proteínas, lipídios, e DNA) são radicais livres de oxigênio, também conhecidos como espécies reativas de oxigênio (ROS). ROS incluem radical de ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical perhidroxil (HOO^{\bullet}), radical de óxido nítrico (NO^{\bullet}), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), oxigênio singlete (1O_2), radical hidroxil ($^{\bullet}OH$), ácido hipocloroso ($HOCl$), radical hipoclorito (ClO^{\bullet}), peroxinitrito ($ONOO^{\bullet}$) e peróxidos lipídicos (LOPs). As ROS podem ser geradas a partir de várias fontes exógenas, como radiação de luz UV, raios X, reações catalisadas por metais, carcinógenos/toxinas ambientais. Metais pesados / de transição, álcool, tabaco, solventes sintéticos, fármacos. Fontes endógenas de ROS incluem o metabolismo do citocromo P450, reações mitocondriais, peroxissomos e ativação de células inflamatórias. Seja através de fonte endógena ou exógena, os radicais livres quando aumentados ou produzidos excessivamente, podem causar alterações / danos oxidativos à todas as macromoléculas celulares. A produção intracelular excessiva de ROS favorece estresse oxidativo celular, que geralmente causa danos ao DNA (RUDRAPAL et al, 2022).

Como existem muitos alvos celulares e moleculares de ROS, as medições de estresse oxidativo e danos em humanos são complexas. Os marcadores biológicos de estresse oxidativo podem ser inespecíficos para uma única via oxidativa; assim, os métodos e marcadores geralmente não são padronizados entre os estudos, dificultando as comparações. A maioria dos estudos mede a presença de biomarcadores formados a partir de reações entre ROS e outras moléculas biológicas e / ou a interrupção das atividades enzimáticas antioxidantes. Exemplos de biomarcadores de estresse oxidativo incluem substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-oxo-dG) e capacidade antioxidante total equivalente (TEAC). Exemplos de enzimas antioxidantes incluem

superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT) e paraoxonase-1 (PON1) (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004; BIRBEN et al., 2012; FRIJHOFF et al., 2015).

Muitos estudos relacionam danos oxidativos com o desenvolvimento de uma variedade de condições crônicas, incluindo doença de Alzheimer (e outros distúrbios neurodegenerativos), diabetes e câncer (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004; MUHAMMAD et al., 2009).

Estudos recentes (que também investigaram danos ao DNA), avaliaram a relação entre a exposição ocupacional à pesticidas e marcadores de estresse oxidativo (KAHL et al., 2018; CATTELAN et al., 2018; SAPBAMRER et al., 2019; LOZANO-PANIAGUA et al., 2018).

Tanto Kahl et al. (2018) quanto Lozano-Paniagua et al. (2018) identificaram que trabalhadores agrícolas expostos à pesticidas tinham níveis significativamente aumentados de biomarcadores de estresse oxidativo, como TBARS. Como as espécies altamente reativas não podem ser determinadas em amostras de fluidos corporais devido à sua meia-vida curta, biomarcadores indiretos de estresse oxidativo (ou seus subprodutos de oxidação) são medidos. O subproduto mais frequentemente medido é o malondialdeído (MDA), um dos principais hidroperóxidos lipídicos produzidos pela degradação peroxidativa de ácidos graxos poli-insaturados de membranas celulares contendo duas ou mais ligações duplas (KAHL et al., 2018; LOZANO-PANIAGUA et al., 2018).

Com relação à atividade das enzimas antioxidantes, Cattelan et al. (2018) observaram que os agricultores que usaram pesticidas reduziram significativamente os níveis de SOD, GPx e glutathione redutase (GSH), em comparação com os agricultores não expostos. Os autores sugeriram que esse efeito poderia representar uma redução do sistema de defesa antioxidante em resposta à um aumento de ROS. Em relação aos biomarcadores de estresse oxidativo, esse mesmo estudo identificou que os agricultores que usaram pesticidas tiveram níveis significativamente mais baixos de TBARS, sugerindo menor estresse oxidativo, em comparação com os agricultores que não usaram pesticidas (CATTELAN et al., 2018).

Contudo, outros estudos recentes sugerem que a exposição ocupacional à pesticidas está associada a elevação, ao invés de redução, da atividade de enzimas antioxidantes. Esses resultados inconsistentes tornam difícil tirar conclusões sobre a relação entre o trabalho agrícola e os biomarcadores de estresse oxidativo.

Sapbamrer et al. (2019) identificaram um aumento significativo da atividade de SOD pós-temporada de aplicação de pesticidas, em comparação com a temporada de pré-aplicação de pesticidas. Eles sugeriram que esse aumento na atividade enzimática antioxidante poderia representar uma resposta adaptativa ao aumento da geração de radicais livres. Esse mesmo estudo também não encontrou nenhuma diferença no 8-oxo-dG entre agricultores antes e depois das épocas de aplicação de pesticidas (SAPBAMRER et al., 2019).

As inconsistências observadas entre esses (e outros estudos encontrados na literatura), podem ser devido à falta de padronização, como: diferentes doses utilizadas de pesticidas; limitações inerentes aos desenhos de estudos transversais; e à dificuldade em fazer medições significativas do estresse oxidativo (CURL et al., 2020).

Em relação ao estresse oxidativo, pode ser ainda devido à coleta não uniforme de amostras biológicas, além de armazenamento e protocolos de avaliação diferentes entre os estudos. Alguns deles determinam a exposição à pesticidas específicos; outros analisam a exposição à misturas complexas. Além disso, legislações e proibições em relação à pesticidas agrícolas variam de acordo com cada país, e a maioria dos estudos foi realizada em diferentes países, com diferentes tipos e diferentes níveis de uso de pesticidas (CURL et al., 2020).

A proteína carbonilada (PC) é um dos biomarcadores mais utilizados na avaliação de estresse oxidativo. Apesar de nem todos os estudos mostrarem o mesmo padrão de resultados, a grande maioria deles mostra que os níveis tanto da PC quanto da MDA costumam estar elevados após exposição à agentes tóxicos; já a atividade de SOD, CAT, GPx, e GSH costumam estar reduzidas. A principal possibilidade é que a toxicidade aumenta o nível de radicais livres, e reduz os níveis de enzimas antioxidantes, o que é uma das grandes causas do aumento do estresse oxidativo. Esse aumento do estresse oxidativo, por sua vez, pode ser devido à aceleração das reações, resultando em peroxidação lipídica e diminuição da atividade de enzimas antioxidantes (NADDAFI et al., 2022).

Uma das células primárias à serem recrutadas durante a inflamação são os neutrófilos. Os mecanismos de defesa dirigidos por neutrófilos envolvem a liberação de enzimas citoplasmáticas que iniciam uma cascata de eventos oxidativos, que levam à destruição de invasores microbianos, apoptose ou dano celular. A mieloperoxidase (MPO) é a principal enzima oxidativa liberada pelos neutrófilos;

juntamente com a liberação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) de DNA, a MPO serve para controlar infecções locais e promover inflamação via produção de ROS e interação com haletos no ambiente celular. Além da MPO ser um bom marcador de inflamação, o uso de marcadores derivados de células imunes permitem relacionar exposição à agentes estressores, com doenças de perfil inflamatório (YUN et al., 2022).

O baixo peso molecular e a alta lipossolubilidade dos pesticidas aumentam a sua absorção e a sua toxicidade. Algumas das principais classes e sua relação com o estresse oxidativo (SULE et al., 2022):

- Pesticidas Organofosforados: um exemplo dessa classe é o inseticida clorpiriflós. Induzem a produção de citocinas inflamatórias, como TNF- α , IL-6 e IL-1 β (em células de carcinoma hepatocelular); ativam microglias com a indução de NADPH oxidase e citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-6 e IL-1 β); aumentam óxido nítrico (NO) e malondialdeído (MDA); induzem alterações nucleares e geração de ROS; aumentam as atividades de caspase-3 e caspase-9 (reduzindo reparo e regulação de DNA durante a apoptose);
- Pesticidas piretroides: um exemplo dessa classe é o inseticida permetrina. Reduzem níveis de CAT, SOD e GPx; aumentam níveis de MDA (devido ao aumento da peroxidação lipídica, induzida pela produção excessiva de ROS); desregulam o sistema imunológico, podendo induzir leucocitose, diminuir a contagem de células natural killer (NK) e aumentar o agrupamento de antígeno de diferenciação 4/grupo de antígeno de diferenciação 8 (interferindo na relação CD4+ /CD8+); afetam a enzima DNA topoisomerase II, que participa do reparo e recombinação do DNA, podendo levar a quebras em certos sítios suscetíveis do genoma, induzindo quebras de fitas duplas (DSB);
- Pesticidas organoclorados: são poluentes orgânicos persistentes; exemplos dessa classe são o inseticida DDT e o paraquat. Relacionados sobretudo à doenças neurodegenerativas, como doença de Parkinson, além de apresentar diversos efeitos comuns aos pesticidas citados anteriormente, relacionados à produção excessiva de ROS. O paraquat relaciona-se com aumento do risco de lesões pulmonares e cerebrais; ele pode gerar vários tipos de ROS intracelulares, pode interagir com

nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase (NOX) e óxido nítrico sintase induzível (iNOS), gerando ROS e RNS no citosol; ativa o NOX tipo 2 (NOX2) na micróglia; também pode interromper a oxidação de NAD(P)H em NAD(P) + que ocorre pelo complexo I da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial (ETC), aceitando elétrons para formar uma versão carregada do paraquat (PQ+).

Todas as classes demonstram capacidade em induzir estresse no retículo endoplasmático (alterando a função proteica); aumento da expressão e atividade do NF- κ B; disfunção mitocondrial; redução de atividade de antioxidantes endógenos (como GPx, CAT, SOD); interferem no mecanismo de autofagia; desregulação da atividade de Nrf2; e desregulação do sistema imunológico (SULE et al., 2022).

2.2.3 Alterações imunológicas e imunofenotipagem por exposição ocupacional a agrotóxicos

Alguns trabalhos relacionam alterações no processo inflamatório com exposição ocupacional à agrotóxicos (CORSINI et al., 2008; DHOUIB et al., 2016; GANGEMI et al., 2016).

No estudo feito por Kahl et al. (2018a), agricultores aumentaram níveis séricos de interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α), além de diminuir a relação de citocinas CD4+ /CD8+, em relação ao grupo controle. Também aumentaram significativamente micronúcleos, buds e pontes citoplasmáticas. O tempo de exposição à pesticidas e a idade dos trabalhadores foram proporcionais às alterações encontradas nas respostas do seu sistema imunológico, sendo proporcional também à polimorfismos XRCC1 e OGG1 (proteínas importantes de reparo de excisão de base / BER). Esses achados sugerem o aumento de danos ao DNA e alteração de resposta imunológica relacionada à exposição por agrotóxicos; além disso, polimorfismos genéticos podem influenciar os resultados de biomarcadores (KAHL et al., 2018a).

TNF- α e IL-6 referem-se à um grupo de citocinas de atividade sobretudo pró-inflamatória. TNF- α tem a capacidade de sinalizar apoptose em células tumorais; IL-6 pode sinalizar parada do ciclo celular e aumento de marcadores de estresse oxidativo (TACHIBANA, et al. 2014; KAHL et al., 2018a). Parâmetros inflamatórios aumentados estão associados à estresse oxidativo elevado (WU et al., 2014). Aumento de

marcadores inflamatórios, como IL-6 em agricultores expostos à pesticidas em relação ao grupo controle, sugere aumento de estresse oxidativo, visto que ambos têm estreita relação, alterando ainda a resposta do sistema imunológico (KAHL et al., 2018a).

Embora os pesticidas não sejam antigênicos, eles podem alterar a resposta do sistema imunológico aos antígenos (CORSINI et al., 2008). CD4+ são células T auxiliares relacionadas à organização do sistema imune; se mostrou diminuída por exposição à agrotóxicos em estudos anteriores; já CD8+ se mostrou aumentado em agricultores. Esse dado sugere aumento de ROS e estresse oxidativo (KAHL et al., 2018a).

De acordo com outros estudos, alguns pesticidas podem inibir a ativação de linfócitos e a proliferação de células T (DHOUIB et al., 2016). Altas proporções de células T CD8+ circulantes sugerem que a inflamação reestimula periodicamente o sistema imunológico (COLATO et al., 2016).

Células T de memória (CD8+) versus células T auxiliares (CD4+) resulta de estímulo excessivo durante infecções agudas; isso já foi observado em agricultores expostos à pesticidas (STEERENBERG et al., 2008). A relevância biológica de uma razão T CD4+ /CD8+ diminuída é um indicador de supressão imunológica (DHOUIB et al., 2016). Quando ainda associado à respostas de anticorpos, pode ser um marcador de imunotoxicidade por compostos químicos (LUSTER et al., 1992). Por outro lado, quando ocorre a inversão dessa razão, torna-se um fator de risco imunológico, podendo se relacionar com diferentes patologias, como por exemplo, imunosenescência prematura (MULLER et al., 2015).

Uma das aplicações mais utilizadas e estudadas pela citometria de fluxo - a imunofenotipagem – tem a capacidade de avaliar múltiplos parâmetros em uma única célula. É um método quantitativo, aplicado sobretudo ao estudo da resposta imune, como ensaios de citotoxicidade e de produção de citocinas e espécies oxidativas. Os dados funcionais, juntamente com a imunofenotipagem, fornecem informações essenciais no estudo das respostas do organismo; permite a detecção e a quantificação de diversas citocinas simultaneamente, além da definição de quais populações celulares estão sendo produzidas: identificação de populações de leucócitos (neutrófilos, monócitos, linfócitos T e B), de subpopulações de linfócitos T (linfócitos T CD4+, T CD8+) e a diferenciação funcional dessas células; identificações de células da imunidade inata, como por exemplo, as células NK, monócitos e células

dendríticas; identificação de células produtoras de citocinas ou com atividade citotóxica; entre outras (de CARVALHO et al., 2010; CUNHA et al., 2012).

2.3.4 ALTERAÇÕES TOXICOLÓGICAS POR EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL A AGROTÓXICOS

Os efeitos mais comuns da exposição à pesticidas incluem a inibição de enzimas colinesterase (AChE e BuChE) e estresse oxidativo, que geralmente levam a outras doenças. O contato com pesticidas pode alterar a maneira como os organismos administram sua energia; após a exposição, eles utilizam sua energia armazenada para responder ao estressor específico, que posteriormente afeta suas funções fisiológicas. As atividades da AChE eritrocitária e da colinesterase plasmática (BuChE) permitem a identificação da exposição ao pesticida; a AChE eritrocitária reflete as concentrações de AChE em órgãos-alvo; a BuChE plasmática pode substituir a AChE na degradação da acetilcolina quando ela está ausente ou inibida, além de ter a capacidade de proteger a AChE de danos e inativação (PARRA-ARROYO et al., 2022).

Os pesticidas organoclorados são mais tóxicos e persistentes do que os pesticidas de outras classes químicas. Seu principal modo de ação é afetar o equilíbrio entre os íons sódio e potássio no sistema nervoso, comprometendo a sua capacidade de transmitir impulsos nervosos; alguns pesticidas dessa classe se ligam aos receptores GABA para impedir que os íons cloreto se infiltrem nos neurônios, fazendo com que eles entrem em um estado altamente excitável, causando tremores e convulsões. O principal modo de ação dos pesticidas organofosforados é através da inibição inespecífica das enzimas colinesterases, situadas nas junções neuromusculares, levando à espasmos musculares voluntários; seu uso extensivo começou depois que os organoclorados foram proibidos em muitos países, devido à sua conhecida toxicidade e persistência. O modo de ação dos carbamatos se assemelha aos organofosforados; eles inibem a acetilcolinesterase, causando contrações musculares e, finalmente, paralisia. Os pesticidas triazínicos inibem o transporte de elétrons (PARRA-ARROYO et al., 2022).

2.2.5 Danos ao DNA por exposição ocupacional a agrotóxicos

Os trabalhadores rurais que vivem próximos às plantações são os mais vulneráveis às exposições nocivas aos agrotóxicos. Além disso, o risco à saúde associado aos pesticidas pode ser modificado pela variação genética na atividade de desintoxicação metabólica (RAMOS et al., 2021).

A concentração mais elevada e a exposição prolongada de espécies reativas de oxigênio (ROS) induzidas por pesticidas levam à danos oxidativos em macromoléculas celulares, como o DNA, e um grande número de quebras de fita (ou fitas) de DNA (RAMOS et al., 2021).

Relatos de efeito de pesticidas sobre biomarcadores (como ensaio cometa, comprimento de telômeros e teste de micronúcleos) em trabalhadores agrícolas são amplamente descritos na literatura. Alguns comparando danos de acordo com diferentes classes de pesticidas (DALMOLIN et al., 2020).

Um estudo recente de meta-análise corrobora a hipótese de que a exposição ocupacional à pesticidas aumenta danos ao DNA e a taxa de mutações. As categorizações relacionadas ao ensaio cometa e o teste de micronúcleos, mostram diferenças significativas entre os grupos exposto e controle, independentemente do gênero dos agricultores (SILVA PINTO et al., 2020).

Outra recente meta-análise identificou que agricultores expostos à pesticidas têm quase cinco vezes mais danos ao DNA do que o grupo controle, demonstrando a toxicidade potencial da exposição ocupacional à agrotóxicos e misturas químicas perigosas, que representam risco em potencial para a saúde humana (NASCIMENTO et al., 2021).

Em um estudo de revisão epidemiológica, considerando o período compreendido entre 2018 e 2019, foi observado um aumento de aberrações cromossômicas e danos no DNA entre os trabalhadores agrícolas expostos à pesticidas, em comparação com o grupo controle. Dessa forma, esses autores concluíram que a exposição a substâncias citotóxicas e genotóxicas pode resultar em aberrações cromossômicas e danos ao DNA, que podem ser precursores de efeitos clínicos, particularmente câncer (CURL et al., 2020).

2.2.5.1 Instabilidade genômica e danos ao DNA

Estima-se que até 10^5 lesões de DNA ocorrem em uma célula ativa de mamífero diariamente, ocasionadas por danos endógenos (ROS; AGEs; danos oxidativos decorrentes de processos inflamatórios) e exógenos (xenobióticos; radiação UV). Embora a maioria dessas lesões seja removida de forma eficiente, algumas são irreparáveis, são reparadas tarde demais ou são reparadas de forma errônea (SCHUMACHER et al., 2021).

As lesões de DNA podem causar mutações, bloquear a transcrição e a replicação e desencadear a resposta ao dano de DNA (DDR). O DDR interrompe a progressão do ciclo celular e ativa as vias de sinalização que afetam o destino da célula: reparo, apoptose ou senescência celular. Esses sistemas altamente complexos incluem não apenas várias vias de reparo específicas para diferentes tipos de lesão, mas também cascatas de sinalização distintas de sensores de dano, amplificadores de sinal e efetores responsáveis por decidir o destino da célula. O sistema DDR tem dois objetivos imediatos: interromper o ciclo celular para evitar a propagação da informação genética corrompida – enquanto fornece tempo para reparar o dano –, assim como coordenar de fato o reparo da lesão de DNA. Dependendo do sucesso dessas etapas anteriores, o destino da célula é então decidido: após as lesões serem reparadas com sucesso, a sinalização DDR cessa, as células sobrevivem e retornam ao seu estado original; no entanto, lesões impossíveis de reparar desencadeiam uma sinalização DDR persistente, que pode então gerar senescência celular ou apoptose (NIEDERNHOFER et al., 2018; da SILVA; SCHUMACHER, 2019).

O dano ao DNA é uma das principais causas do câncer; além disso, relaciona-se com o envelhecimento e com as doenças associadas ao envelhecimento (NIEDERNHOFER et al., 2018).

O genoma nuclear e o mitocondrial são constantemente ameaçados por insultos genotóxicos. As fontes exógenas são, até certo ponto, evitáveis; incluem radiação ultravioleta (UV) e ionizante, bem como uma variedade de produtos químicos genotóxicos. Fontes endógenas, por outro lado, são inevitáveis, pois incluem subprodutos metabólicos, como espécies reativas de oxigênio (ROS), e reações químicas espontâneas que visam moléculas de DNA (incluindo alquilação e hidrólise de ligações químicas de DNA). As quebras de fita simples (SSBs) constituem a maioria das lesões de DNA, pois podem surgir da hidrólise de bases e danos oxidativos; erros durante a replicação do DNA ocorrem em uma taxa baixa, mas podem levar a

substituições de um único nucleotídeo. ROS causam lesões oxidativas no DNA, como 8-oxoguanina. Lesões causadas por fontes exógenas podem ser mutagênicas e também altamente citotóxicas (da SILVA; SCHUMACHER, 2019).

As quebras de fita simples de DNA (SSBs) correspondem a 75 % das lesões. Elas podem ser convertidas em quebras de fita dupla de DNA (DSBs) que acarretam danos mais graves, mas são menos frequentes (TUBBS; NUSSENZWEIG, 2017).

Outras alterações na estrutura do DNA são: oxidação ou alcalinação das bases de DNA, ligações covalentes entre bases de DNA (*crosslinks* DNA-DNA) ou proteínas (*crosslinks* DNA-proteína) (FRIEDBERG, 2008).

Alto nível de oxidação do DNA produz 7,8-diidroxi-8-oxo-2'-desoxiguanosina (8-OHdG). Os telômeros tornam-se mais susceptíveis à sofrer lesão de DNA por ROS do que outras regiões do genoma. As guaninas triplas presentes nas estruturas teloméricas TTAGGG conferem elevada reatividade oxidativa; as lesões oxidativas da guanina podem dar configurações teloméricas que diminuem a eficiência de reparo do DNA (PISOSCHI et al., 2021).

A resposta inflamatória promove a progressão tumoral pela síntese de moléculas bioativas no microambiente tumoral. A geração de ROS associada é capaz de ativar vias de sinalização, como a proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) / proteína ativadora 1 (AP-1) e NF- κ B, induzindo proliferação celular (PISOSCHI et al., 2021).

Modificações oxidativas induzidas em proteínas e lipídios também têm sido associadas ao aparecimento e progressão de tumores. A lipoxidação de proteínas pode contribuir para a progressão da doença, envolvendo o transdutor de sinal e a ativação da sinalização da transcrição 3 (STAT 3), uma via que contribui para a progressão do tumor, ativada em muitos tipos de câncer. As diferentes vias de sinalização adaptativas ativadas pela lipoxidação de sensores de proteínas-chave incluem a resposta de proteínas de choque térmico (Hsp), fator nuclear 2 relacionado ao fator eritróide 2 (Nrf2) e sinalização de quinase de estresse, que pode conferir maior resistência ao estresse. A ativação dessas vias, como Nrf2 e Hsp, favorecem mecanismos de defesa celular (PISOSCHI et al., 2021).

Existem três categorias de genes envolvidos no desenvolvimento do câncer (BOUYAHYA et al., 2022):

- Proto-oncogenes - genes normais que codificam fatores de crescimento, receptores, transdutores intracelulares e proteínas

nucleares. Esses genes estão implicados em numerosos processos de sinalização celular, ciclo celular, diferenciação celular, embriogênese e proliferação celular. Alterações genéticas como mutação pontual, amplificação gênica, inserção de base, deleção ou translocação em um único alelo desses genes, podem induzir a ativação da transcrição do gene (ganho de função) e, conseqüentemente, ativação e alteração do ciclo celular das vias metabólicas celulares (nesse caso, os genes passam a ser chamados de oncogenes);

- Genes supressores de tumor - estão envolvidos no ciclo celular, manutenção da integridade do genoma, meiose, apoptose, diferenciação celular, transcrição de sinal e transdução; são responsáveis por controlar o crescimento celular;
- Genes de reparo de DNA - também chamados de guardiões da integridade do genoma; são genes que detectam e reparam danos no DNA. Mutações nesses genes induzem instabilidade genética que causa deleções, duplicações, translocações, aneuploidias e outras aberrações cromossômicas. A perda de função desses genes está associada a diferentes tipos de câncer – por exemplo, no câncer de mama ocorre uma mutação em um gene de reparo de DNA, BRCA1 ou BRCA2; uma perda de função de um desses genes induz uma alteração no reparo do DNA e, portanto, o desenvolvimento de câncer.

O estresse oxidativo está associado à três estágios de desenvolvimento do câncer (CHIKARA et al., 2018):

1) Iniciação - Durante o estágio de iniciação, o estresse oxidativo leva à mutações em oncogenes e genes supressores de tumor. Níveis elevados de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG) estão associados ao estresse oxidativo; são observados em tecidos pré-cancerosos e cancerosos ou linhagens de células cancerígenas, em comparação com tecidos normais. A presença de 8-OHdG resulta em mutações sem sentido de GC para TA, que se não forem reparadas antes da replicação do DNA, produzirão células transformadas;

2) Promoção - A fase de promoção, caracterizada pela expansão clonal de células transformadas / iniciadas, também pode ser regulada por ROS. A oxidação de resíduos de cisteína e metionina em proteínas pode afetar a sua estrutura e as atividades enzimáticas, resultando na desregulação de várias vias de sinalização,

como por exemplo, PI3K / AKT, Keap1-Nrf2-ARE, NF- κ B e JAK / STAT. Radicais livres interferem ainda nas proteínas fosfatases; após a inativação por oxidação mediada por ROS, as fosfatases são incapazes de desfosforilar (e, portanto, inativar) proteínas-alvo, como aquelas pertencentes às vias de sinalização PI3K / AKT, levando à sua proliferação;

3) Progressão - Níveis elevados de ROS contribuem para a fase de progressão da carcinogênese, gerando instabilidade genômica adicional, o que aumenta o potencial metastático das células tumorais.

Lesões distintas de DNA têm consequências distintas para uma célula. As substituições de nucleotídeos seguidas de replicação incorreta levam ao acúmulo de mutações e aberrações cromossômicas, aumentando o risco de desenvolvimento de câncer. Por outro lado, lesões mais volumosas também podem bloquear a replicação e a transcrição, levando à interrupção do ciclo celular e possivelmente, à senescência celular ou apoptose.

Para evitar isso, as células desenvolveram sistemas de reparo de DNA complexos e altamente conservados, capazes de responder a tipos específicos de lesões. São eles (da SILVA; SCHUMACHER, 2019):

- Erros de pares de base e exclusões / inserções curtas, reparados pelo reparo de incompatibilidades (MMR);
- Quebras de fita simples, reparadas por cascatas complexas: Lesões que distorcem a hélice (como os dímeros de ciclobutano pirimidina), reparadas pela via de reparo por excisão de nucleotídeos (NER); Lesões oxidativas e pequenos produtos de alquilação, reparados por reparo por excisão de bases (BER);
- Quebras de fitas duplas altamente citotóxicas, reparadas pela via de junção de extremidade não homóloga (NHEJ) eficiente, mas propensa à erros; ou pela via de recombinação homóloga, mais precisa (HR).

As lesões de DNA mais comuns, SSBs, são reparadas por complexas cascatas de sinalização de reparo de quebra de fita simples (SBBR), iniciadas quando a proteína sensora poli (ADP-ribose) polimerase 1 (PARP-1) detecta e se liga às SSBs; é então seguido pelo processamento final do DNA, preenchimento de lacunas e ligação. Lesões oxidativas e que distorcem a hélice são os tipos comuns de danos ao DNA e são principalmente reparadas por três principais vias de reparo por excisão: BER (o principal mecanismo de combate aos efeitos deletérios causados por ROS);

MMR (corrige erros de pares de base e *loops* curtos de deleção / inserção originados de erros de replicação; garante a manutenção da estabilidade do genoma após a replicação do DNA); NER (remove lesões de DNA que distorcem a hélice em quatro etapas consecutivas: reconhecimento da lesão; desenrolamento do DNA; excisão de danos; e síntese e ligação de DNA) (da SILVA; SCHUMACHER, 2019).

Os DSBs (altamente citotóxicos), são reparados principalmente pela NHEJ (eficiente, mas propensa a erros), ou pela HR, mais precisa. O NHEJ atua em células somáticas (ou células em proliferação no estágio G1) e é capaz de unir as extremidades da fita de DNA por meio de diferentes subvias, dependendo da configuração das extremidades do DNA; no entanto, ele funciona sem um modelo adequado, pois ocorre independentemente da replicação e, portanto, muitas vezes resulta em mutações (deleções ou inserções). Por outro lado, o HR atua em células em proliferação; após a replicação, o HR usa a cópia idêntica disponível do DNA danificado para alinhar adequadamente as extremidades quebradas e reparar a lesão, promovendo assim, a sobrevivência celular sem contribuir para um aumento da carga mutagênica (da SILVA; SCHUMACHER, 2019).

O sistema de reparo de DNA, reverte os danos antes que ocorram mutações permanentes no genoma. Os mecanismos de ação de reparo das quebras de SSBs envolvem o reparo de bases modificadas a partir da excisão de bases (BER), a detecção e reparo de bases incorporadas incorretamente durante a replicação (MMR) e o reparo por excisão de nucleotídeos (NER) (TUBBS; NUSSENZWEIG, 2017). Para o reparo por BER e NER, é feita a remoção da lesão e a sequência é restaurada por uma enzima DNA polimerase, que utilizará a fita não danificada como molde (AZQUETA et al., 2019).

O reparo de DSBs, é feito a partir da recombinação homóloga (HR), que ocorre nas fases S / G2 do ciclo celular, no qual as regiões afetadas são trocadas por regiões equivalentes quando há a disponibilidade de uma das cromátides irmãs. Enquanto o mecanismo de junção final não homóloga (NHEJ) religa as extremidades da fita, sem o uso de um modelo, podendo levar a inserções ou exclusões no ponto de fusão, sendo menos fidedigno que o reparo mediado por HR (TUBBS; NUSSENZWEIG, 2017; AZQUETA et al., 2019).

O genoma é o modelo principal que codifica todas as informações genéticas, mas é surpreendentemente instável. A instabilidade do genoma é a tendência de sofrer mutação (ou qualquer alteração permanente e transmissível da sequência de

DNA), como uma substituição de base, uma deleção ou inserção, variação do número de cópias, aberração cromossômica ou retro-transposição (SCHUMACHER et al., 2021).

As mutações geralmente têm efeitos adversos na função e são uma das principais causas de câncer e doenças genéticas. Mutações ocorrem tanto no genoma nuclear quanto no mitocondrial; é uma consequência da replicação ou reparo errôneo, muitas vezes começando por danos ao DNA. Portanto, a instabilidade do genoma pode ser uma característica inerente do DNA de sofrer modificação química (denominada dano ao DNA), que altera a sua estrutura e as suas propriedades funcionais (SCHUMACHER et al., 2021).

Com o tempo, as lesões de DNA inevitavelmente se acumulam; assim, a instabilidade do genoma é uma marca registrada do envelhecimento. A senescência celular interrompe permanentemente a proliferação em resposta a vários estresses, muitos dos quais estão ligados a danos no DNA. Células senescentes adquirem um fenótipo secretor associado à senescência, secretando muitas citocinas pró-inflamatórias, proteases e fatores de crescimento e angiogênese que podem perturbar os microambientes e comprometer a estrutura e a função do tecido, contribuindo assim para patologias associadas ao envelhecimento (locais e sistêmicas), e promovendo o câncer (KRTOLICA et al., 2001; RODIER et al., 2009; SCHUMACHER et al., 2021).

Danos ao DNA se relacionam diretamente com as nove marcas do envelhecimento: 1) instabilidade genômica; 2) desgaste de telômeros; 3) alterações epigenéticas; 4) perda de proteostases; 5) detecção desregulada de nutrientes; 6) disfunção mitocondrial; 7) senescência celular; 8) exaustão de células-tronco; e 9) comunicação intercelular alterada (LÓPEZ-OTIN et al., 2013; SCHUMACHER et al., 2021). Atualmente, essas marcas foram acrescidas de mais 3: 10) alterações no microbioma; 11) autofagia desregulada; 12) inflamação. Assim, temos 12 marcadores de envelhecimento (LÓPEZ-OTIN et al., 2023).

Os mecanismos de reparo de DNA tendem à ficar mais ineficientes com o avançar da idade, associado à maior incidência de mutações no DNA. Além disso, as células senescentes tendem à se acumular nesse período da vida. As células senescentes ativam um fenótipo secretor associado à senescência (SASP), levando a um estado de inflamação sistêmica de baixo grau, associado à um fenótipo de envelhecimento precoce (NIEDERNHOFER et al., 2018).

O estresse oxidativo está intimamente ligado à iniciação e progressão do câncer. Quantidades moderadas de ROS promovem a sinalização de estresse, e contribuem para mutações, favorecendo o desenvolvimento do câncer. A produção de ROS mitocondrial desregula a sinalização redox celular ligada à respostas proliferativas. A ativação de fatores de transcrição como HIFs (fator induzível por hipóxia) promove a tumorigênese. O DNA mitocondrial também pode ser prejudicado por ROS (PISOSCHI et al., 2021).

As intervenções nutricionais afetam o envelhecimento e a expectativa de vida em todo o reino animal. A restrição calórica (quantidade e qualidade nutricional) retarda o envelhecimento prematuro em camundongos mutantes de reparo de DNA, provavelmente por diminuir os níveis de ROS e outros compostos reativos, levando a níveis reduzidos de danos ao DNA. As mudanças que promovem a longevidade nas vias de detecção de nutrientes também podem estimular o próprio reparo do DNA, sugerindo que alguns dos benefícios para a saúde observados no envelhecimento normal, podem ser devido à uma melhor manutenção do genoma. Restrição calórica promove ativação de vias de adaptação (como SIRT1 e AMPK) e aumenta a capacidade de NER (LÓPEZ-OTIN et al., 2013; WU et al., 2013; VERMEIJ et al., 2016; SCHUMACHER et al., 2021).

2.2.5.2 Epigenética, danos ao DNA e pesticidas

A epigenética é a mudança hereditária na função do gene, que pode influenciar a expressão do gene e os níveis subsequentes de expressão da proteína, sem alterar a sequência do DNA. As modificações epigenéticas incluem: metilação do DNA; modificação de histonas; e a atividade de microRNAs. Esses mecanismos se coordenam em redes complexas para controlar a expressão gênica, regulando assim os principais processos fisiológicos, incluindo o funcionamento do sistema imunológico. Influenciados por estímulos ambientais e mecanismos fisiológicos, os sinais epigenéticos funcionam como uma memória molecular, e podem ser mantidos por meio da divisão celular (YI; McGEE, 2021).

Em condições inflamatórias, os mecanismos epigenéticos servem como um elo crítico entre os fatores de risco ambientais e a suscetibilidade genética. Doenças de perfil inflamatório têm fatores ambientais conhecidos, que contribuem para o aparecimento e a variabilidade fenotípica da doença. Estímulos externos implicados

na etiologia de algumas dessas doenças, incluem o tabagismo, infecções, dieta e poluição, que alteram direta e / ou indiretamente o perfil epigenético. Além disso, as exposições ambientais podem desregular a expressão da maquinaria modificadora da epigenética, como as enzimas DNA metiltransferase (DNMT) e histona desacetilase (HDAC) (YI; McGEE, 2021).

Poluentes ambientais estão envolvidos, por exemplo, no desenvolvimento e / ou progressão de várias doenças neurodegenerativas e neurológicas, através de modificações epigenéticas e indução de ruptura do epigenoma. Produtos químicos como metais pesados, pesticidas, solventes, podem desregular a expressão do gene, influenciando a sua transcrição, degradação e tradução do RNAm. Alterações anormais na metilação do DNA, miRNAs, ou modificação de histonas, podem servir como biomarcadores para neurotoxicidade (YU et al., 2021).

Pesticidas organofosforados, como alguns inseticidas (por exemplo, o clorpiriflós), matam insetos por perturbar o seu sistema nervoso; logo, também exercem efeitos neurotóxicos em humanos. O mecanismo epigenético da neurotoxicidade do clorpiriflós envolve o miR132 /212, que se mostra elevado na região do hipocampo CA1, interrompendo os processos cognitivos mediados pela neurotrofina após a administração do inseticida. Ele aumenta ainda a suscetibilidade à toxicidade induzida por estresse oxidativo, pela via de sinalização miR-181 / SIRT1 / PGC-1 α / Nrf2. Os efeitos adversos da exposição ao clorpiriflós persistem na idade adulta, e até mesmo nas gerações futuras (YU et al., 2021).

Pesticidas organoclorados, como o inseticida DDT, têm estudos que relacionam a sua exposição com alterações no padrão de metilação de DNA, relacionadas à doença de Parkinson. Inseticidas piretroides, como a permetrina, induzem alterações cerebrais à longo prazo; essas alterações envolvem o comprometimento precoce do padrão epigenético na neurodegeneração, como metilação do DNA ou alterações de histonas. Herbicidas, como o paraquat, têm diversos estudos relacionando a sua neurotoxicidade com a doença de Parkinson, relacionadas às alterações na metilação de DNA, modificação de histonas, e alteração na expressão de diversos miRNAs (como a superexpressão do miR153, que altera a atividade do Nrf2, e a regulação negativa da expressão de miR-17-5p, induzida por aumento de ROS, que contribui para a neurodegeneração dopaminérgica, influenciando a proliferação celular, apoptose celular e transição de fase S do ciclo celular) (YU et al., 2021).

A neurotoxicidade pode ser induzida por exposição aguda alta ou por exposição crônica em doses baixas. A exposição crônica à pesticidas em baixa dose é um fator de risco para o desenvolvimento da doença de Alzheimer, doença de Parkinson, esclerose lateral amiotrófica (ELA) e transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH). Muitos trabalhadores rurais sofrem intoxicação não intencional por agrotóxicos, devido à inalação ou absorção pela pele (YU et al., 2021).

2.2.6 Marcadores de instabilidade genômica e danos ao DNA

Embora não haja um único teste padronizado para aberrações cromossômicas e danos ao DNA, e as medições envolvam biomarcadores moleculares e *endpoints*, os procedimentos mais amplamente usados e aceitos são os ensaios cometa e micronúcleos (FENECH, 2008; COLLINS, 2014; MOLLER, 2018; NERSESYAN et al., 2022).

2.2.6.1 Ensaio cometa

O ensaio cometa é uma forma simples de detectar quebras de DNA. As células são incorporadas em agarose, lisadas, e submetidas à eletroforese em pH alto; O DNA contendo quebras é desenhado em direção ao ânodo, formando uma imagem semelhante a um cometa.

Além disso, mede danos no DNA de vários tipos, incluindo danos oxidativos induzidos por ROS. As aplicações incluem testes de genotoxicidade, biomonitoramento humano, ecogenotoxicologia, bem como pesquisa básica sobre danos e reparos de DNA (COLLINS, 2014).

O ensaio cometa permite a avaliação quantitativa dos danos ao DNA que os pesticidas podem causar em indivíduos expostos; tem a capacidade de auxiliar na previsão e biomonitoramento (NASCIMENTO et al., 2021).

O ensaio cometa é um biomarcador que quantifica lesões ao DNA passíveis de reparo decorrentes de SSBs, DSBs, *crosslinks* DNA-DNA, *crosslinks* DNA-proteínas e formação de sítios alcali-lábeis (BURLINSON et al., 2007). É um método altamente sensível, detectando baixas frequências de dano de DNA (GUNASEKARANA et al., 2015; GAJSKI et al., 2019).

Esta técnica é baseada em uma eletroforese de célula única, na qual o DNA danificado irá migrar para o ânodo após corrida eletroforética. Previamente à eletroforese, as células com agarose são dispostas sobre uma lâmina, que entrará em contato com uma solução de lise para remover membranas e histonas (AZQUETA et al., 2019). Depois a lâmina é imersa em uma solução alcalina, a fim de reverter os sítios álcali-lábeis em quebras. Assim, as quebras de DNA irão migrar para o ânodo da eletroforese. A intensidade do dano ao DNA é classificada em 4 classes, sendo 0 ausência de dano, 1 as células com dano mínimo, 2 as células com danos médios, 3 as células com danos intensos e 4 as células com danos máximos, conforme mostrado na Figura 1 (OLIVE; BANÁTH, 2006; GAJSKI et al., 2019).

Durante a eletroforese, o DNA (carregado negativamente), é atraído pelo ânodo, mas só se move sensivelmente se contiver quebras. O DNA é ligado em intervalos a uma matriz nuclear, enrolado em torno dos núcleos de histonas dos nucleossomos; embora as histonas não estejam mais presentes, o superenrolamento permanece porque as alças de DNA são restringidas por sua ligação à matriz. Uma quebra de fita relaxa o superenrolamento e, portanto, os laços quebrados podem se estender em direção ao ânodo, formando a cauda do cometa. O tamanho relativo da cauda reflete o número de *loops* de DNA e, portanto, a frequência de quebras de DNA (COLLINS, 2014).

Essa técnica fornece medidas como o comprimento, formato e / ou intensidade da cauda do cometa (conhecido como momento da cauda do cometa), detectando os vários tipos de danos ao DNA, incluindo quebras de fita simples e dupla. Uma cauda mais longa, momento aumentado ou porcentagem de DNA aumentada na cauda são considerados indicadores de dano ao DNA (COLLINS, 2004; NANDHAKUMAR et al., 2011; MOLLER, 2018).

O oxigênio reativo causa quebras de DNA – mas também muitos outros agentes, e as quebras também podem aparecer como intermediários no reparo do DNA. Um indicador mais específico de ataque oxidativo é a presença de purinas ou pirimidinas oxidadas. O ensaio básico do cometa foi modificado para detectá-las, introduzindo uma incubação dos nucleoides (logo após a lise), com enzimas de reparo bacteriano; as enzimas combinam uma atividade glicosilase específica, removendo a base danificada e criando um sítio apurínico / apirimidínico (AP) e uma AP liase que converte o sítio AP em uma quebra. A enzima endonuclease III (endo III) é específica para pirimidinas oxidadas, enquanto a enzima formamidopirimidina DNA

glicosilase (FPG), atua sobre a 8-oxo-7,8-dihidroguanina (8-oxodG). Um aumento na detecção de cauda após a incubação com enzimas, em comparação com uma incubação apenas com tampão, indica a presença de bases oxidadas (COLLINS, 2014).

É um ensaio simples, rápido, barato, direto, preciso e confiável (COLLINS, 2014; GAJSKI et al., 2019; NASCIMENTO et al., 2020; NASCIMENTO et al., 2021).

O ensaio cometa modificado por enzimas tem sido amplamente utilizado, particularmente no biomonitoramento humano, para determinar os níveis de bases oxidadas em linfócitos; detecta ainda o nível de dano oxidativo endógeno afetado pela intervenção com antioxidantes dietéticos (COLLINS, 2014).

Figura 1 – Células submetidas ao ensaio Cometa coradas com solução de prata.

Classes de dano



Fonte: elaborado pela autora.

A Figura 1 demonstra as classes de dano de DNA, após a corrida eletroforética e coloração com prata do ensaio cometa. A classificação é feita como 0 para as células sem danos, 1 para as células com dano mínimo, 2 para células com dano médio, 3 para células com dano intenso e 4 para células com dano máximo.

2.2.6.2 Micronúcleos com bloqueio de citocinese celular (Cytome - CBMN)

O acúmulo de danos em decorrência da exposição ocupacional à agrotóxicos é tempo e exposição-dependente. Sendo assim, a exposição prolongada aumenta níveis de danos citogenéticos em trabalhadores rurais. As frequências de

micronúcleos aumentam ainda com o envelhecimento, como prova de instabilidade genômica associada com a idade (FENECH et al., 2011; BOLOGNESI; HOLLAND, 2016; KAHL et al., 2018a). Micronúcleos são o biomarcador mais relevante e melhor validado de instabilidade genômica em todos os tipos de células indicadoras (NERSESYAN et al., 2022).

A técnica de CBMN é um biomarcador para instabilidade genômica em linfócitos de sangue periférico, que permite avaliar os danos de DNA que permaneceram após os mecanismos de reparo. Essa técnica foi descrita primeiramente em 1986 por Fenech e Morley (FENECH; MORLEY, 1986). Para identificar micronúcleos (MN) é necessário estimulá-los a se dividir, usando fitohemaglutinina, e cultivá-los por um período suficientemente longo na presença de citocalasina B, para permitir que pelo menos uma divisão celular ocorra. Isso permite a formação e expressão de MN durante a anáfase e telófase – estágio do ciclo mitótico em que as células são bloqueadas no estágio binucleado (BN), pela citocalasina B. MN e outras anomalias nucleares associadas, como pontes nucleoplásmicas e brotos nucleares, podem ser pontuadas em células binucleadas (BN) (NERSESYAN et al., 2022).

Com o CBMN é possível identificar a presença de micronúcleos (MN) derivados de quebras ou perdas cromossômicas; pontes nucleoplasmáticas (NPNPs), provenientes do reparo incorreto de quebras de DNA ou fusões de porções finais dos telômeros; e *buds* nucleares (NBUDs), que são produtos da eliminação de DNA amplificado ou complexos de DNA reparado. A partir de 2007, esta técnica passou ainda a permitir a avaliação do índice mitótico, através da presença de células mononucleadas, binucleadas, trinucleadas e tetranucleadas e o status de viabilidade celular, por meio da análise da presença de células que estão no estado de apoptose ou necrose (Figura 2) (FENECH, 2007; FENECH et al., 2016). Sendo assim, as células são classificadas de acordo com o status de viabilidade (apoptose e necrose), índice mitótico (células mononucleadas, binucleadas, multinucleadas), e o dano e / ou instabilidade cromossômica (presença de MN, NBUD e NPNP) (FENECH, 2007). As taxas de divisão celular podem aumentar como consequência de efeitos citotóxicos agudos; o aumento da atividade mitótica desempenha um papel fundamental na transformação maligna celular (NERSESYAN et al., 2022).

A ocorrência de parâmetros CMBN reflete respostas relacionadas à instabilidade cromossômica e desafios citostáticos causados por exposição à agentes

genotóxicos exógenos (KAHL et al., 2018a). Cromossomos dicêntricos são resultantes de fusões finais ou reparo incorreto do DNA, ambos decorrentes de quebras de fitas simples (FENECH et al., 2016a).

Micronúcleos (MN) são corpos extranucleares que contêm fragmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros. Frequências aumentadas de micronúcleos em sangue periférico de indivíduos saudáveis refletem instabilidade genômica e um maior risco de desenvolver câncer mais tarde, sugerindo um papel preditivo do ensaio. Considerando que o câncer se desenvolve à partir de mutações acumuladas, danos no DNA não reparados, derivados de exposição constante à substâncias químicas podem contribuir para a progressão do câncer (BONASSI et al., 2007; NERSESYAN et al., 2022).

Pontes nucleoplasmáticas resultam de cromossomos dicêntricos causadas por reparo incorreto de quebras de DNA, induzidas por exemplo, por exposição à produtos químicos, ou como resultado de fusões terminais de telômeros que podem resultar da perda de telômeros ou sua disfunção (induzida, por exemplo, por deficiência de folato) (NERSESYAN et al., 2022).

Os biomarcadores de genotoxicidade são de grande importância como indicativos de potenciais danos genéticos, como mutações, que podem levar em longo prazo, ao desenvolvimento de doenças e câncer, por exposição à pesticidas e misturas de pesticidas. O ensaio cometa (ou eletroforese em gel unicelular) e o teste de micronúcleo são ensaios rápidos, de baixo custo, sensíveis à pesticidas e misturas, e ainda podem ser realizados tanto em amostras de mucosa oral quanto de sangue periférico, ou seja, utilizam amostras biológicas com métodos pouco invasivos (VALVERDE; ROJAS, 2009; SILVA PINTO et al., 2020).

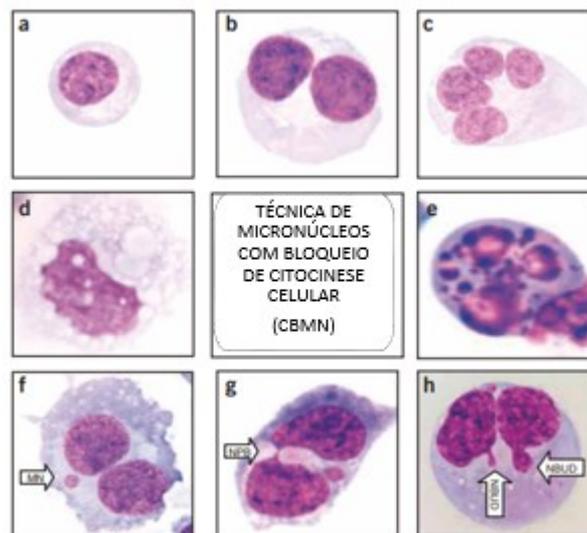
O ensaio cometa como mencionado, consiste basicamente da avaliação de quebra de fita de DNA; já o teste de micronúcleo avalia a ocorrência de quebra cromossômica ou má formação do fuso mitótico durante a divisão celular (SILVA PINTO et al., 2020).

Análises de micronúcleos (MN) em linfócitos do sangue periférico (e células esfoliadas de diferentes órgãos, como boca, nariz, bexiga e colo do útero), são as abordagens mais utilizadas para detectar danos no material genético em humanos. MN são corpos extranucleares contendo DNA, que podem ser identificados microscopicamente. Eles refletem aberrações cromossômicas estruturais e numéricas e são formados como consequência da exposição a genotoxinas ocupacionais,

ambientais e de estilo de vida. Eles também são induzidos como consequência da ingestão inadequada de certos oligoelementos e vitaminas. As altas taxas de MN estão associadas ao aumento do risco de câncer e à uma série de outras doenças. As medidas de MN podem ser úteis para o diagnóstico e prognóstico de diferentes formas de câncer e outras doenças, como inflamação, infecções e distúrbios metabólicos (NERSESYAN et al., 2022).

É importante que em estudos, haja grupo exposto x grupo controle. Também é importante que os grupos sejam comparáveis em relação às suas características demográficas (incluindo etnia, idade, sexo, consumo de álcool e tabaco); o índice de massa corporal (IMC) e os hábitos alimentares podem ter impacto nas taxas de MN. O consumo de micronutrientes específicos, necessários como cofatores na replicação e reparo do DNA, ou nos mecanismos de defesa antioxidante (como ácido fólico, vitamina B12, niacina, selênio e zinco), têm um papel importante na prevenção da instabilidade genômica e na formação de MN; compostos fenólicos também têm impacto na modulação de danos ao DNA. Exercício físico e boa qualidade de sono também podem influenciar nas taxas de MN (NERSESYAN et al., 2022).

Figura 2 – Alterações encontradas através da técnica de micronúcleos (CBMN).



Fonte: elaborado pela autora. Adaptado de Fenech et al., 2007

A Figura 2 apresenta as alterações encontradas pela Técnica de Micronúcleos com bloqueio de citocinese celular. Células coradas com Giemsa: a) célula mononucleada; b) célula binucleada (BN); c) célula multinucleada; d) célula necrótica; e) célula apoptótica; f) célula binucleada contendo micronúcleo (MN); g) célula BN contendo ponte; h) célula BN contendo *bud*. a; b; c = índice mitótico; d; e = viabilidade celular; f; g; h = alterações nucleares.

2.2.7 Instabilidade genômica e microRNAs

O objetivo principal da via de resposta ao dano de DNA (DDR) é manter a integridade e estabilidade do genoma. Quebra de fita simples (SSB) e quebra de fita dupla de DNA (DSB), duas alterações comuns na estrutura do DNA, induzem mecanismos de DDR, tais como: parada do ciclo celular (ou desaceleração de sua progressão); identificação desses danos na estrutura do DNA; e, finalmente, tradução de sinais para recrutar fatores de reparo de DNA para o local da lesão. Pode ocorrer ainda apoptose (para danos irreparáveis), bem como indução transcricional de vários genes que facilitam o reparo do DNA (CURTIN, 2012).

Menos de 2 % do genoma humano codifica proteínas. Os microRNAs são RNAs não codificantes; eles têm como objetivo controlar os níveis de expressão do gene, tais como: modificação transcricional e pós-transcricional; transdução de sinal; e tradução do gene. RNAs não codificantes têm ainda função oncogênica ou supressora de tumor, participando da ocorrência, progressão do ciclo celular, diferenciação celular, apoptose e resposta ao dano de DNA, por diversos mecanismos (MALAKOTI et al., 2021).

MiRNAs são moléculas de RNA curtas e de fita simples, com 20 - 22 nucleotídeos de comprimento. Esses pequenos RNAs não codificantes desempenham papéis imperativos em processos celulares como DDR e desenvolvimento de câncer devido à sua interação direta ou indireta com DNA, RNA e proteínas (MAJIDINIA; YOUSEFI, 2016).

Estresse oxidativo e modificações epigenéticas, como a metilação do DNA, podem alterar a expressão de miRNAs (ZHAN et al., 2020).

Por exemplo, o miR-17-5p tem expressão reduzida após exposição ao pesticida paraquat; esse herbicida pode causar danos em células nervosas; a redução da expressão desse miRNA relaciona-se com os mecanismos de neurotoxicidade induzida pelo pesticida, contribuindo com os efeitos pró-apoptóticos observados (WANG et al., 2018). Outro estudo identificou que o paraquat pode induzir variações de metilação do DNA por meio da produção de ROS, levando à redução da expressão de miR-17-5p em danos às células nervosas induzidas pelo pesticida (ZHAN et al., 2020).

A citotoxicidade de pesticidas induz produção de ROS, que causam danos celulares. Dessa forma, o organismo produz espécies reativas oxidativas, induzindo

desequilíbrio e estresse oxidativo, que por sua vez, ativa a imunidade inata do endotélio, desregulando a função endotelial. A expressão de miR-92a encontra-se aumentada nesse contexto; assim, níveis elevados desse miRNA podem exacerbar a disfunção das células endoteliais expostas ao estresse oxidativo (CHEN et al., 2015).

Diversos estudos mostram uma associação significativa entre a exposição à substâncias tóxicas ambientais e a incidência de câncer, principalmente exposições à metais pesados e pesticidas (COSTA et al., 2017).

Existem mecanismos epigenéticos que podem alterar a expressão do gene, tais como: metilação do DNA; modificações de histonas; e expressão de miRNAs. Todos eles podem ser induzidos por exposição à substâncias tóxicas, como os agrotóxicos (CHOU et al., 2010; HUMPHREY et al., 2019).

Em um estudo recente, alguns miRNAs foram considerados preditivos de status ocupacional (trabalhador rural x trabalhador não agrícola) durante a temporada de colheita. A expressão de quase todos miRNAs mostrou-se alterada em decorrência da exposição aos metabólitos gerados à partir de pesticidas organofosforados em trabalhadores rurais (WELDON et al., 2016).

Portanto, diversos estudos evidenciam que pesticidas (assim como metais, poluentes orgânicos, fumaça de cigarros e drogas cancerígenas), podem impactar miRNAs. MiRNAs ambientalmente alterados e relacionados ao câncer podem servir como marcadores potenciais para cânceres quimicamente induzidos (LI et al., 2018; HUMPHREY et al., 2019).

2.3 RADICAIS LIVRES

Radicais livres são gerados dentro do corpo em quantidades limitadas, e são necessários para: manter a homeostase celular; transdução de sinais; expressão gênica; ativação de receptores; reconhecimento de patógenos; garantir viabilidade celular, proliferação, migração, diferenciação. Assim, espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS), atuam como moléculas sinalizadoras por alterações redox reversíveis em enzimas que controlam processos celulares; por exemplo, S-nitrosação da caspase-3 (que controla a apoptose), ou ativação do fator nuclear kappa B (NF- κ B, que controla a inflamação, por inibidor de estabilização da quinase do fator kappa B – I κ B, mediada pela oxidação –SH) (PISOSCHI et al., 2021).

Assim, o estresse oxidativo pode ser caracterizado por sua intensidade: como estresse oxidativo fisiológico (eustress), ou estresse oxidativo tóxico, alterando biomoléculas (distress): a baixa exposição de células e organismos é necessária para a sinalização redox, direcionada a alvos peculiares, enquanto a exposição elevada resulta na interrupção da sinalização redox e /ou decaimento, abordando alvos inespecíficos (PISOSCHI et al., 2021).

Nos macrófagos, ROS são produzidos enzimaticamente para destruir patógenos, mas eles não conseguem diferenciar entre células hospedeiras e agentes infecciosos; sua produção excessiva resulta no comprometimento de células e órgãos hospedeiros. Reações não enzimáticas responsáveis pela ocorrência de ROS ocorrem também durante a cadeia respiratória; as reações de transferência de elétrons mantêm o gradiente de íons através da membrana - o aceptor final é dotado de alto potencial redox e, portanto, gerando energia durante a reação de redução (PISOSCHI et al., 2021).

Radicais livres também são gerados em processos enzimáticos não ligados à cadeia de transporte de elétrons mitocondrial. O radical ânion superóxido pode resultar da redução de oxigênio molecular em uma etapa, mas também pode ser produzido por NADPH oxidases. As enzimas do citocromo P450 e NO sintases, quando desacopladas, geram oxidantes endógenos. O ataque radical aos ácidos graxos poli-insaturados gera hidroperóxidos orgânicos, atuando também como oxidantes endógenos. A mieloperoxidase (MPO) catalisa a conversão do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em espécies reativas oxigenadas ou nitrogenadas (incluindo $\bullet OH$, $ONOO^-$, $HOCl$ e NO_2). A NADPH oxidase está envolvida principalmente na produção de ROS vasculares. A xantina oxidase e a NO endotelial “desacoplada” sintase (eNOS) são geradores de radicais livres endoteliais, com um papel importante na evolução, progressão e complicações da doença arterial coronariana, insuficiência cardíaca e diabetes, ou seja, patologias ligadas à disfunção endotelial (PISOSCHI et al., 2021).

O ataque contínuo de ROS destrói a permeabilidade seletiva da membrana celular, o que resulta em peroxidação lipídica. O ataque oxidativo às proteínas altera a configuração, causando perda da funcionalidade bioquímica, enquanto as alterações oxidativas do DNA levam à mutações, erros de replicação, alterações da estabilidade genômica e morte celular. A oxidação do sítio ativo da cisteína em ácido sulfênico por espécies oxigenadas (por exemplo, H_2O_2) é reversível; no entanto, a

oxidação a ácido sulfínico e, posteriormente, sulfônico é irreversível. Essas alterações afetam a tirosina fosfatase, pois esta enzima contém um resíduo de cisteína redox-ativo cuja oxidação torna a enzima inativa. O aumento da fosforilação da tirosina resultante pode induzir a mudança conformacional da proteína, alterando a sua função (PISOSCHI et al., 2021).

A peroxidação lipídica pode gerar produtos carbonílicos saturados e insaturados, como 4-hidroxinonenal, acroleína, malondialdeído (MDA) e heptanal. As carbonilas derivadas de lipídios são produtos da oxidação de ácidos graxos poli-insaturados (livres ou esterificados por fosfolipídios); são um grupo de compostos eletrofílicos dotados de alta reatividade, capazes de atacar substratos nucleofílicos, como porções de aminoácidos (modificação essa conhecida como lipoxidação de proteínas) (PISOSCHI et al., 2021).

Esses grupos carbonila ligados à proteínas podem vir à partir de várias vias, sendo que a primeira envolve a oxidação direta de resíduos de aminoácidos (desaminação oxidativa no grupo ϵ -amino dos resíduos de lisina, levando ao semialdeído aminoalípico) (PISOSCHI et al., 2021).

A modificação indireta da proteína também pode ocorrer, incluindo principalmente a adição de produtos oxidados de lipídios ou carboidratos. As alterações mais importantes desse tipo incluem: adição de Michael envolvendo compostos carbonilados α , β -insaturados formados por peroxidação lipídica (como adição de 4-hidroxi-nonenal em porções de lisina, cisteína ou histidina), reações de resíduos de aminoácidos (por exemplo, de lisina ou arginina) com compostos dicarbonílicos formados por peroxidação lipídica ou por auto-oxidação de glicose (glioxal e malondialdeído). A carbonilação de proteínas, englobando a carbonilação das cadeias laterais de aminoácidos (como arginina, lisina, prolina e treonina), pode ser seguida por reticulação de proteínas intracelulares (PISOSCHI et al., 2021).

A modificação de biomoléculas essenciais é frequentemente acompanhada pela perda de suas funcionalidades ou por mudanças em sua localização celular. As alterações irreversíveis em lipídios, proteínas e ácidos nucléicos, juntamente com o dano induzido à estrutura e funções celulares, têm sido relacionadas à neurodegeneração, doença cardiovascular, tumorigenicidade, diabetes, entre outras doenças de perfil inflamatório. Biomoléculas oxidadas também podem resultar na ocorrência de neoantígenos participando da progressão de doenças autoimunes. Uma vez que alterações irreversíveis, como a carbonilação, não podem ser restauradas por

nenhuma intervenção de enzimas celulares, a remoção de biomoléculas modificadas das células é necessária para reduzir os efeitos tóxicos. As células se beneficiam de várias maneiras de responder ao estresse tóxico. Os compostos carbonilados resultantes da peroxidação lipídica podem ser removidos por conjugação com glutathione ou podem ser reduzidos a álcoois. Álcool celular e aldeído desidrogenases podem oxidar compostos carbonílicos em ácidos carboxílicos que têm menor reatividade. As proteínas oxidadas estão sujeitas à degradação proteossomal que depende do sistema 20S ativado pelo estresse oxidativo, permitindo a eliminação rápida de substratos modificados independente de ATP e ubiquitina. Além disso, vias de autofagia-lisossomais também são altamente eficazes na remoção de biomoléculas alteradas (PISOSCHI et al., 2021).

2.4 ANTIOXIDANTES

As espécies reativas de oxigênio (assim como as espécies reativas de nitrogênio e as espécies reativas de enxofre), são conhecidas por induzirem danos oxidativos à lipídios, proteínas, açúcares e DNA (ALI et al., 2020; LI et al., 2021).

Os radicais livres (além dos agentes oxidantes não radicalares), são espécies químicas reativas potencialmente prejudiciais, contendo um elétron desemparelhado; tendem a se neutralizar ao reagir com outras substâncias, causando a oxidação. Entre os ROS, destacam-se: os radicais superóxidos (O_2^-); os radicais hidroxila ($\cdot OH$); e os oxidantes não radicais, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ácido hipocloroso (HOCl). Seus efeitos deletérios são resultado das alterações de biomoléculas orgânicas, como os ácidos graxos poli-insaturados em lipídeos de membrana, oxidação proteica, quebra de fita de DNA, oxidação de RNA, despolarização mitocondrial e apoptose (ALI et al., 2020; LI et al., 2021).

Antioxidantes são moléculas que inibem, diminuem, atrasam ou eliminam completamente a ação dos radicais livres e agentes oxidantes, protegendo o corpo do dano oxidativo (ALI et al., 2020; LI et al., 2021).

Os antioxidantes se dividem em: enzimáticos, como superóxido dismutase (SOD); catalase (CAT); glutathione peroxidase (GPx); e não enzimáticos (como polifenóis, vitaminas e minerais) (ALI et al., 2020; LI et al., 2021; RUDRAPAL et al., 2022).

Os antioxidantes enzimáticos removem radicais livres e espécies reativas; em seguida ocorre a eliminação de radicais livres por doadores de elétrons, como por exemplo, glutathione (GSH), tocoferóis, ácido ascórbico e tioredoxina. Outros mecanismos incluem a ligação de íons metálicos pró-oxidantes (como ferro e cobre) por proteínas de ligação metálicas específicas, como por exemplo, transferrina e metalotioneína. Portanto, antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos atuam em conjunto, possibilitando a eliminação de radicais livres do organismo de forma mais eficiente (ALI et al., 2020; LI et al., 2021).

Os antioxidantes podem prevenir a geração de espécies oxidantes, reduzir os efeitos de oxidantes metabólicos ou xenobióticos perigosos, prevenindo o corpo de doenças agudas ou crônicas e reparando danos celulares. Eles atuam tanto em processos patológicos quanto em processos fisiológicos do organismo, como por exemplo, no envelhecimento saudável. Atuam como agentes de sinalização em várias vias celulares (conhecidas como sinalização redox). Fatores de transcrição, como AP-1, NF- κ B e Nrf2, estão envolvidos nessas vias de sinalização moduladas por redox (ALI et al., 2020; LI et al., 2021).

Os antioxidantes são compostos que bloqueiam as reações oxidativas, prolongando a vida útil dos produtos alimentícios. Os antioxidantes dietéticos e os suplementos antioxidantes extinguem as ROS e podem prevenir diferentes doenças crônicas. Alimentos funcionais ou nutracêuticos são definidos como alimentos ou ingredientes que melhoram a saúde; eles contêm suplementos dietéticos como proteínas, vitaminas, minerais e / ou fitoquímicos (ALI et al., 2020; LI et al., 2021).

O estresse oxidativo tem sido implicado na patogênese de muitas doenças crônicas, incluindo o processo inflamatório. Tanto o estresse oxidativo quanto a inflamação são processos fisiopatológicos intimamente relacionados, e ambos são encontrados simultaneamente em muitas condições patológicas (BISWAS, 2016). Durante o processo inflamatório, as células fagocíticas ativadas (como neutrófilos e macrófagos), produzem grandes quantidades de ROS para matar os agentes invasores. Em condições inflamatórias patológicas, pode haver geração exagerada de espécies reativas, e algumas delas se difundem para fora das células fagocíticas e assim, podem induzir estresse oxidativo localizado, e lesão tecidual. No entanto, além da produção direta de espécies reativas pelas células fagocíticas, as células não fagocíticas também podem produzir espécies reativas em resposta às citocinas pró-inflamatórias (LI et al., 2015; ALI et al., 2020; LI et al., 2021).

Assim como o processo inflamatório pode induzir estresse oxidativo, o estresse oxidativo também pode induzir inflamação, por meio da ativação de múltiplas vias. A espécie reativa H_2O_2 , por exemplo, pode induzir inflamação por meio da ativação do fator de transcrição NF- κ B. O estresse oxidativo desempenha um papel importante na ativação do inflamassoma da proteína 3 do receptor semelhante a NOD (NLRP3). O inflamassoma NLRP3 é um complexo molecular oligomérico que desencadeia defesas imunológicas inatas por meio da maturação de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e IL-18. O ROS liberado de mitocôndrias danificadas ativa inflamassomas de NLRP3, levando a IL-1 β induzir secreção e inflamação localizada. Portanto, a inflamação e o estresse oxidativo estão intimamente relacionados e ligados a processos fisiopatológicos interdependentes (BISWAS, 2016; ALI et al., 2020).

O acúmulo de ROS pode desencadear estresse oxidativo envolvendo muitos processos biológicos, incluindo apoptose, necrose e autofagia. A autofagia pode ser alterada por estresse oxidativo e peroxidação lipídica. A autofagia é uma via de degradação altamente conservada que pode reciclar nutrientes e organelas para permitir que as células se adaptem a ambientes indesejáveis; degrada e digere células danificadas, senescentes e com função de perda (ALI et al., 2020; LI et al., 2021).

Em condições fisiológicas, radicais livres são gerados principalmente nas mitocôndrias, via metabolismo aeróbio. Em condições patológicas, mitocôndrias disfuncionais produzem ROS em excesso, quebrando a homeostase celular. O processo de remoção de mitocôndrias danificadas por meio da autofagia é denominado mitofagia, que é, portanto, crítico para a manutenção das funções celulares; elimina mitocôndrias danificadas, modulando a evolução de doenças de perfil inflamatório. Em resposta ao estresse oxidativo, a autofagia e a mitofagia contribuem para a função antioxidante (ALI et al., 2020; LI et al., 2021).

O Nrf2 é o fator de transcrição redox que regula a expressão de genes antioxidantes (SOD; CAT; GPx); é portanto, o mecanismo de defesa citoprotetora crucial contra o estresse oxidativo. A defesa antioxidante possibilita que o organismo se adapte às exposições ambientais que induzem danos celulares (LI et al., 2021).

FoxO é o fator de transcrição que forma um complexo com SIRT1 sob condições de estresse oxidativo, garantindo sobrevivência celular; induz a expressão de genes relacionados à autofagia. Além disso, tem várias funções biológicas, incluindo: a interrupção do ciclo celular nos pontos de verificação G1 - S e G2 - M;

redução de ROS; reparo de DNA danificado; e apoptose. Os membros da família FoxO (FoxO 1, 3, 4 e 6), coordenam as expressões gênicas em processos celulares (como apoptose e estresse oxidativo). Por exemplo, como um alvo de classe III histona / proteína desacetilase, a sirtuína 1 (SIRT1): FoxO1 forma um complexo com SIRT1 sob estresse oxidativo, resultando na ativação de parada do ciclo celular, induzindo genes relacionados à adaptabilidade, promovendo assim, a sobrevivência celular (LI et al., 2021).

Diversos compostos naturais obtidos através da dieta têm a capacidade de reduzir estresse oxidativo e promover autofagia. Fitoquímicos são sequestradores eficazes de radicais livres; eles atuam por diferentes vias. Por exemplo, o sulforafano (encontrado no brócolis), tem a capacidade de induzir a expressão de genes que promovem autofagia; os flavonoides (encontrados em frutas cítricas), são antioxidantes com potencial em suprimir carcinogênese e com atividade anti-inflamatória; isoflavonas (presentes na soja), têm atividade antioxidante, indutora de autofagia e anti-inflamatória (LI et al., 2021).

Entre os antioxidantes naturais não enzimáticos encontram-se ainda os carotenoides (como o betacaroteno e o licopeno); os micronutrientes dietéticos, como a vitamina A (retinol), a vitamina C (ácido ascórbico) e a vitamina E (α -tocoferol e tocotrienol); minerais, como o zinco e o selênio; cofatores, como a coenzima Q10. Eles funcionam como barreira de defesa contra os radicais livres e agentes oxidantes não radicais, e previnem o ataque ao DNA, proteínas, lipídios e outras moléculas induzidas por pró-oxidantes (ALI et al., 2020).

Os compostos orgânicos que possuem um anel aromático com pelo menos um grupo hidroxila são denominados “fenólicos”. O composto que possui um ou mais anéis aromáticos com mais de um grupo hidroxila é chamado de polifenol (ou composto fenólico) (MICHALAK et al., 2021; RUDRAPAL et al., 2022).

A maior classe de compostos antioxidantes é a dos polifenóis. São compostos químicos orgânicos contendo dois ou mais grupos hidroxila, ligados à anel aromático.

Eles se dividem em cinco grupo principais, distinguidos com base em sua estrutura química (MICHALAK et al., 2021):

- 1) Estilbenos – exemplo: resveratrol;
- 2) Diferuloilmetanos – exemplo: curcumina;

- 3) Ácidos fenólicos – que se dividem ainda em: ácidos benzoicos e ácidos cinâmicos. Exemplos de ácidos benzoicos: ácido gálico e ácido elágico; exemplos de ácidos cinâmicos: ácido cafeico e ácido ferúlico;
- 4) Flavonoides – se dividem ainda em: (A) Flavonas; (B) Flavonóis; (C) Flavanonas; (D) Flavanois; (E) Flavanonois; (F) Isoflavonas; (G) Antocianinas. Exemplos: (A) apigenina; luteolina; (B) quercetina; kaempferol; (C) naringenina; (D) catequinas; epicatequinas; epigallocatequinas; (E) taxifolina; (F) genisteína; (G) cianidina;
- 5) Taninos condensados – exemplos: polímeros de catequinas; polímeros de epicatequinas; proantocianidinas.

O estresse oxidativo é considerado uma causa primária ou secundária para muitas doenças inflamatórias crônicas, doenças neurodegenerativas, distúrbios metabólicos, câncer e doenças cardiovasculares. A ingestão dietética de frutas e vegetais frescos tem efeitos claros contra uma série de doenças que envolvem estresse oxidativo. Os polifenóis dietéticos atuam como eficientes sequestrantes de radicais livres e espécies reativas de oxigênio (ROS), de acordo com a teoria bioquímica de eliminação, devido à presença de: característica estrutural aromática; múltiplos grupos hidroxila; e um sistema altamente conjugado. Eles têm a capacidade de sequestrar, neutralizar e / ou eliminar ROS, ou ainda suprimir o estresse oxidativo celular, permitindo-lhes evitar danos oxidativos em biomoléculas (como lipídios, proteínas, e DNA) e, assim, diminuir a inflamação dos tecidos (RUDRAPAL et al., 2022).

Portanto, a capacidade dos polifenóis dietéticos em suprimir a inflamação e, conseqüentemente, o dano oxidativo aos tecidos é mediada pelos seus efeitos antioxidantes, interferência nas vias de sinalização celular e supressão de mecanismos de transdução de sinais de mediadores pró-inflamatórios, e vias inflamatórias celulares em nível molecular (RUDRAPAL et al., 2022).

A produção excessiva de ROS resulta em danos extensos e irreversíveis no DNA, como quebras de fita simples ou dupla, modificações de bases e ligações cruzadas de DNA, podendo levar à morte celular. Várias vias de sinalização mediadas por ROS, cuja desregulação favorece a carcinogênese, podem ser moduladas por fitoquímicos (CHIKARA et al., 2018).

O fator nuclear 2 relacionado ao fator E2 (Nrf2) é um fator de transcrição que se liga ao elemento de resposta antioxidante (ARE) na região flanqueadora 5' de

genes antioxidantes e de desintoxicação em resposta ao estresse oxidativo. O papel protetor do câncer da via Nrf2 é devido a sua capacidade de desintoxicar e eliminar eficientemente ROS e, conseqüentemente, impedir o DNA de sofrer altos níveis de danos oxidativos. Os efeitos antioxidantes de fitoquímicos interferem em diferentes sinalizações celulares, incluindo o favorecimento da atividade de Nrf2, bem como interferindo em diferentes estágios da carcinogênese (CHIKARA et al., 2018).

2.4.1 Antioxidantes e exposição a agrotóxicos

A N-acetilcisteína (NAC), um poderoso antioxidante que impacta os níveis de GSH (precursor da sua síntese, via cisteína) quando administrada demonstrou, em estudos anteriores, efeitos protetores contra o estresse oxidativo (LI et al., 2021). Em relação à danos induzidos por pesticidas, diferentes estudos apresentaram sua atividade antioxidante em modelos animais (LUKASZEWICZ-HUSSAIN; MONIUSZKO-JAKONIUK, 2004; CANKAYALI et al., 2005; SHADNIA et al., 2007; YURUMEZ et al., 2007) e ainda a sua capacidade em prevenir o aumento de MDA sanguíneo (LUKASZEWICZ-HUSSAIN; MONIUSZKO-JAKONIUK, 2004).

NAC associada à vitamina E (α -tocoferol) apresenta atividade protetora *in vivo*, após intoxicação aguda com pesticidas. Essa associação recuperou a inibição de AChE, além de recuperar os níveis de glutathiona endógena (reduzida pela exposição ao agrotóxico) (CANKAYALI et al., 2005; SHADNIA et al., 2007).

As vitaminas C e E reduziram o aumento do nível plasmático de MDA em modelos animais, intoxicados com agrotóxicos; os autores sugeriram que foi devido sua atividade antioxidante, redutora de radicais livres (GUNEY et al., 2007).

A melatonina (poderoso antioxidante endógeno) tem efeito protetor no estresse oxidativo induzido por intoxicação aguda à agrotóxicos em modelo animal (BUYUKOKUROGLU, M.E. et al., 2008).

A teofilina, um inibidor específico de fosfodiesterase, que catalisa a hidrólise dos nucleotídeos cíclicos AMPc e GMPc em seus correspondentes 5-monofosfato inativos, reduziu o estresse oxidativo induzido por pesticidas, recuperando parâmetros antioxidantes (GHAFOUR-RASHIDI et al., 2007).

Portanto, a suplementação com antioxidantes naturais ou sintéticos, parece ser benéfica após danos induzidos por pesticidas. Contudo, modelos animais não refletem necessariamente efeitos clínicos. Assim, ensaios clínicos são necessários

para que se conheça a eficácia dos antioxidantes na proteção contra a toxicidade induzida por agrotóxicos (LUKASZEWICZ-HUSSAIN, 2010).

Uma recente revisão enfatiza a necessidade de estudos sobre suplementação antioxidante em populações diretamente expostas à pesticidas; os autores identificaram diversos antioxidantes com potencial em reversão de danos e estresse oxidativo induzidos por agrotóxicos em modelos animais. Entre eles: vitamina C, vitamina E, vitamina A, zinco, selênio, ácidos graxos poli-insaturados, NAC e curcumina (MEDITHI et al., 2021).

A espécie *Vitis vinífera*, L. tem grandes quantidades de compostos fenólicos, tais como: ácidos fenólicos; flavonóis; flavonas; flavanonas; taninos; flavan-3-óis; proantocianidinas; antocianinas; e estilbenos. Essa espécie tem múltiplas atividades farmacológicas: anticancerígena; antifúngica; antibacteriana; antioxidante; e atividades anti-inflamatórias (CHEDEA et al, 2021).

O paraquat aumenta a expressão de miR-136-5p e o estresse oxidativo celular, assim como inibe a atividade da via de sinalização Nrf2 / hemeoxigenase-1 (HMOX1), além de promover apoptose celular. O miR-136-5p mostra-se superexpresso em tecidos cerebrais, relacionado à inflamação e estresse oxidativo causados por lesão de isquemia-reperfusão. O resveratrol, presente na *Vitis vinífera*, L., reduz a expressão desse miRNA, a resposta ao estresse oxidativo e a apoptose celular. Além disso, o resveratrol favorece a atividade da via de sinalização Nrf2 / HMOX1, a função celular e a taxa de sobrevivência em células tratadas com paraquat (ZHANG et al., 2022).

2.4.2 Extrato de semente de uva rico em proantocianidinas

Alguns flavonoides (como flavan-3-óis), catequinas e epicatequinas, polimerizam e formam taninos. Os taninos condensados são chamados de proantocianidinas. Portanto, proantocianidinas são produtos oligoméricos e poliméricos da via biossintética dos flavonoides, constituídos de catequinas e epicatequinas (IGLESIA et al., 2010; RAUF et al., 2019).

Nesses flavonóides poliméricos, as unidades elementares estão ligadas por ligações C-C e ocasionalmente C-O-C. A condensação oxidativa ocorre entre o carbono C4 do heterociclo e os carbonos C6 ou C8. Com base em seus anéis B, quatro dímeros de proantocianidinas do tipo B mais comuns são B1, B2, B3 e

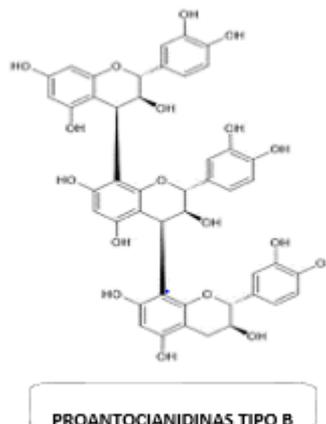
B4 relacionados a ligações químicas C4-C8, enquanto B5, B6, B7 e B8 contêm ligações de interflavona C4-C6 (RAUF et al., 2019).

As proantocianidinas são dímeros ou trímeros de flavanóis em forma condensada, também conhecidos como taninos condensados. Com base nas ligações interflavônicas, elas podem ser divididas em tipo A (ligação C2–O–C7 ou C2–O–C5) ou tipo B (C4–C6 ou C4–C8). Eles geralmente são produzidos a partir de materiais ricos em flavonoides durante a fermentação. Anéis C abertos contendo flavonóides são categorizados como chalconas (RUDRAPAL et al., 2022).

As maiores fontes de proantocianidinas são as frutas vermelhas e roxas, como mirtilo, framboesa, ameixa, morango e uva. As proantocianidinas de sementes de uva (*Vitis vinífera*, L.) são consumidas como suplemento dietético (RAUF et al., 2019).

Complexos oligoméricos de proantocianidinas (OPCs) demonstram ações antioxidantes, antibacterianas, antivirais, anticarcinogênicas, antiinflamatórias, antialérgicas e vasodilatadoras em diferentes estudos (Figura 3). Eles podem inibir a peroxidação lipídica, a agregação plaquetária, e a hipermeabilidade capilar. Além disso, demonstram atividade na apoptose, expressão gênica e fatores de transcrição, como o NF-κB (FINE, 2000; COS et al., 2004; RAUF et al., 2019). Segundo Shi e colaboradores (2003), a atividade antioxidante das proantocianidinas é 20 vezes maior do que a vitamina E, e 50 vezes maior do que a vitamina C (SHI et al., 2003).

Figura 3 – Estrutura molecular das proantocianidinas oligoméricas (OPCs).



Fonte: elaborado pela autora. Adaptado de Mancini et al., 2023.
A Figura 3 apresenta a estrutura molecular de proantocianidinas do tipo B.

Em modelos animais, o extrato de semente de uva rico em proantocianidinas (GSPE) apresenta atividade antioxidante, reduzindo estresse oxidativo e facilitando atividade mitocondrial. Modula a via do NO /GMPc, demonstrando potencial cardioprotetor. Demonstrou ainda potencial neuroprotetor (RAUF et al., 2019).

Ainda em estudos pré-clínicos, GSPE pode estimular a transformação de linfócitos, aumentar a atividade lisossomal e a capacidade fagocítica de macrófagos peritoneais; reduzem a inflamação nas vias aéreas de modelos de asma murina, reduzindo células inflamatórias, citocinas TH2 e os níveis séricos de IgE. Em modelo de osteoartrite, GSPE reduziu a perda de condrócitos e proteoglicanos. OPC inibiu a apoptose induzida por IL-1 β em condrócitos, diminuindo o conteúdo de ROS e os níveis de metaloproteinases de matriz (MMPs) (TONG et al., 2011; YIN et al., 2017; RAUF et al., 2019).

Um estudo avaliando modelos animais após a administração crônica de pesticidas (demonstrando comprometimento de aprendizado, memória e coordenação motora, além de aumento acentuado de estresse oxidativo e redução na atividade de AChE), avaliou o tratamento com nicorandil, clinidipina e extrato de semente de uva rico em proantocianidinas (GSPE). Os três tratamentos quando combinados, melhoraram todos os parâmetros avaliados, demonstrando um melhor efeito neuroprotetor contra neurotoxicidade do que utilizados individualmente (SINGH et al., 2016).

O GSPE foi testado em outro estudo pré-clínico quanto ao potencial em reverter neurotoxicidade induzida por pesticidas. Comparado com o extrato de ameixa, o extrato de semente de uva demonstrou maior capacidade em reversão de danos induzidos pelo agrotóxico utilizado, reduzindo ainda disfunção mitocondrial (e assim, ativando vias pró-sobrevivência, essenciais para viabilidade de neurônios expostos à pesticidas), demonstrando a sua capacidade em reduzir danos induzidos, mesmo quando utilizado individualmente (STRATHEARN et al., 2014).

GSPE em outro estudo pré-clínico recente, demonstrou reduzir peroxidação lipídica, (medida por níveis de MDA) induzida por pesticidas, além de reestabelecer outros parâmetros modificados pela exposição: reduziu estresse oxidativo; aumentou níveis de GSH; aumentou atividade de PON1 e BChE. Além disso, danos ao DNA também foram avaliados; GSPE reduziu danos induzidos por pesticidas, observado no ensaio cometa, demonstrando reduzir citotoxicidade e genotoxicidade, induzidas por agrotóxicos (ABDEL-SALAM et al., 2018).

O GSPE demonstrou atividade protetora em lesão hematopoiética induzida por radiação ionizante em camundongos; a análise de citometria de fluxo revelou que as porcentagens de células T e B aumentaram, enquanto a porcentagem de células mieloides diminuíram no sangue periférico de camundongos irradiados, quando tratados com GSPE, sugerindo sua capacidade em reduzir mielossupressão. Além disso, esse mesmo estudo demonstrou a sua capacidade em reduzir ROS e danos ao DNA, aumentando ainda a expressão de FOXO1, SOD1, SOD2 e CAT – modulando, portanto, vários processos fisiológicos, como ciclo celular, apoptose, autofagia e homeostase energética, assim como estresse oxidativo e transcrição de genes de enzimas antioxidantes (QI et al., 2021).

O GSPE diminuiu os níveis de chumbo nos ossos de ratos expostos à esses metais pesados, mas não modificou o nível de chumbo no fígado (provavelmente porque o acúmulo de chumbo varia em diferentes tecidos); já a apoptose induzida em hepatócitos pelo chumbo foi reduzida pelo GSPE, através da redução de danos ao DNA, e restauração de níveis equilibrados de membros da família Bcl-2. Também favoreceu a atividade antioxidante, aumentando a atividade de GSH e SOD, protetores contra o estresse oxidativo induzido por chumbo, e a peroxidação lipídica do fígado dos animais expostos. O chumbo aumentou a expressão do miR-153, e diminuição da expressão de Nrf2; o GSPE reduziu a expressão de miR-153, ativando a sinalização de Nrf2 (LIU et al., 2018).

Efeitos protetores antioxidantes do GSPE foram observados contra a toxicidade induzida por cádmio, e as alterações induzidas nos túbulos seminíferos e no interstício testicular de ratos (esse metal pesado tende a se acumular nos testículos). A atividade da caspase-3 nos testículos foi aumentada pela intoxicação pelo metal; o pré-tratamento com GSPE reduziu a sua expressão (envolvido em apoptose celular). O GSPE reduziu citocinas pró-inflamatórias (como TNF- α , IL-1 β , IL-6, iNOS), aumentando ainda a expressão de Nrf2 e a atividade de enzimas antioxidantes (SOD, GPx, CAT). O cádmio inibe o reparo por excisão de nucleotídeos, envolvido na remoção de um amplo espectro de lesões de DNA induzidas, como o reparo de danos oxidativos no DNA; o GSPE protegeu o dano oxidativo do DNA e a fragmentação do DNA induzida pelo metal pesado - um possível mecanismo é que as proantocianidinas presentes no GSPE neutralizaram os radicais livres gerados antes de atingirem o DNA, favorecendo o seu reparo (BASHIR et al., 2019).

O GSPE aumentou níveis de SOD, CAT e GPx, assim como reduziu níveis de MDA e PC em células tratadas com pesticidas, demonstrando a sua atividade antioxidante e capacidade de redução de estresse oxidativo e peroxidação lipídica, induzida por esses agentes tóxicos (NADDAFI et al., 2022).

GSPE reduziu a expressão de miR-19a e -19b em camundongos, que costumam estar aumentados em células neoplásicas pulmonares; a redução na sua expressão correlaciona-se com a diminuição da proliferação celular e indução de apoptose, bem como a regulação positiva das expressões de IGF2R e PTEN (alvos de miR-19 a/b). GSPE também aumentou a atividade de PTEN e diminuiu a fosforilação de AKT - um fator pró-carcinogênico chave no câncer de pulmão. A via PI3K /AKT é ativada em vários tipos de câncer; GSPE diminui a fosforilação de AKT, impedindo a ativação dessa via (MAO et al., 2016).

Dados experimentais *in vitro* e *in vivo* sugerem que o GSPE pode atuar como um agente anticancerígeno. As atividades quimiopreventivas potenciais incluem proliferação reduzida, apoptose aumentada, parada do ciclo celular em células tumorais e modulação da expressão e atividade de genes direcionados ao NF-κB, incluindo invasão e alvos moleculares específicos de metástase (NANDAKUMAR et al., 2008).

Em estudos clínicos, o extrato de semente de uva tem atividades farmacológicas sobretudo relacionadas às suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, em dosagens em torno de 300 mg, administradas entre uma e duas vezes ao dia, por 12 semanas (SLAWINSKA et al., 2022).

Quando administrado por via oral (VO), o GSPE em doses entre 200 mg e 300 mg, tem a capacidade de prevenir dor epigástrica, após 12 semanas (RAUF et al., 2019).

A administração VO de GSPE na dosagem de 400 mg ao dia demonstrou efeitos cardiprotetores, mantendo a elasticidade vascular e a pressão arterial normal em pacientes pré-hipertensos, após 12 semanas (ODAI et al., 2019; SLAWINSKA et al., 2022).

O GSPE administrado VO por adolescentes com síndrome metabólica, associado à restrição calórica, em dosagens entre 100 mg e 300 mg ao dia, por 8 a 12 semanas, tem atividade hipoglicêmica, melhora a concentração de insulina e a resistência à insulina (MOHAMMAD et al., 2021; SLAWINSKA et al., 2022).

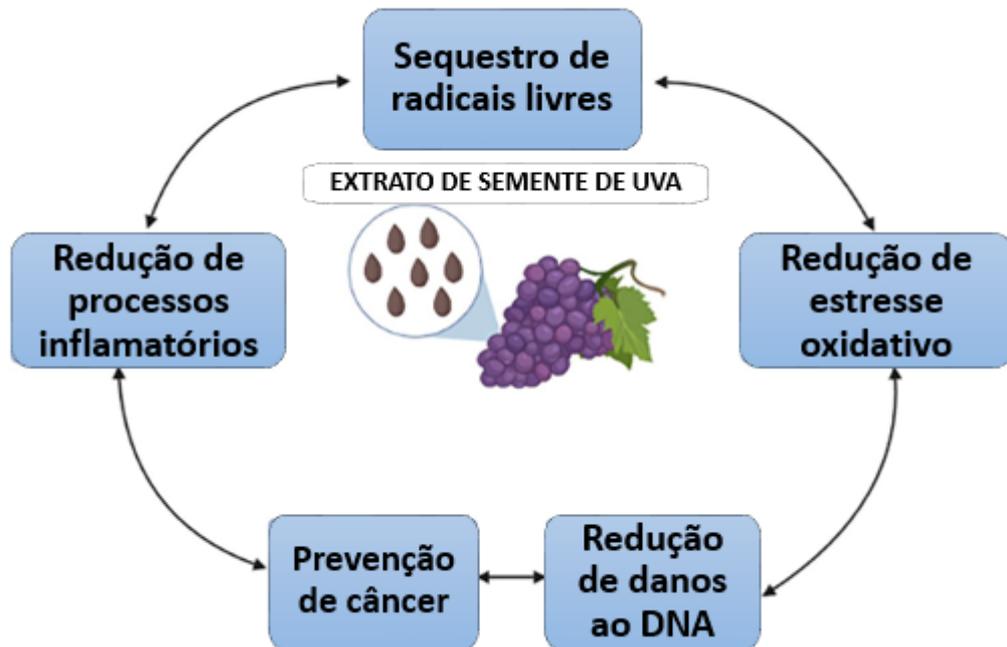
A suplementação de GSPE, aliada à uma dieta de restrição calórica, reduziu o índice de adiposidade visceral, colesterol total e triglicerídeos, quando administrado na dosagem de 300 mg ao dia, por 12 semanas (YOUSEFI et al., 2021).

Pacientes com dermatite alérgica de contato ao níquel reduziram a liberação de citocinas pró-inflamatórias e óxido nítrico, além de aumentar os níveis de IL-10 (interleucina anti-inflamatória), após suplementação com GSPE (VO), na dosagem de 300 mg ao dia, por 12 semanas (MAGRONE et al., 2021).

Como o extrato de semente de uva rico em proantocianidinas (GSPE) exerce efeitos promissores, protetores contra doenças cardiovasculares, distúrbios metabólicos e eventos oncogênicos, espera-se que seja um agente farmacêutico potencial para o tratamento de tais condições clínicas. Sendo assim, estudos clínicos duplo-cegos precisam ser conduzidos com agentes terapêuticos como esse, para fornecer mais informações sobre a sua eficácia clínica e segurança, apoiados por evidências científicas robustas (RAUF et al., 2019).

Nosso grupo de pesquisa publicou um artigo de revisão à respeito da capacidade de constituintes do extrato de semente de uva, sobretudo flavan-3-óis (proantocianidinas oligoméricas), em reduzir danos ao DNA, radicais livres, marcadores de estresse oxidativo e inflamação, quando avaliados em estudos *in vitro*, *in vivo* e *ex vivo* (Figura 4) (MANCINI et al., 2023).

Figura 4 – Principais atividades farmacológicas do extrato de semente de uva.



Fonte: elaborado pela autora. Adaptado de Mancini et al., 2023.

A Figura 4 apresenta as principais atividades farmacológicas relacionadas ao extrato de semente de uva.

2.4.2.1 MASQUELIER® OPCs

Masquelier's® Original OPCs (Anthogenol®) é um composto padronizado contendo flavan-3-óis monoméricos e oligoméricos, extraídos de sementes de uva (*Vitis vinifera L.*), comercialmente disponível em vários suplementos alimentares (WESELER; BAST, 2017). Em 1987, Jack Masquelier obteve a patente de uso de proantocianidinas como antioxidantes, pelo US Patent Office (MASQUELIER, 1987).

In vitro, foi demonstrado que OPCs de Masquelier® são promissores na proteção contra a contração térmica do colágeno (por aumento da temperatura ou estresse oxidativo), evitando o encurtamento de fibras (MASQUELIER et al., 1981). Além disso, preveniu a oxidação da vitamina C (MASQUELIER, 1951).

O composto apresenta efeitos anti-inflamatórios promissores em modelos animais (BLAZSO; GLABOR, 1980; BARBIER et al., 1988).

Dados clínicos mais recentes do extrato de semente de uva de Masquelier® Original OPCs (no suplemento alimentar Anthogenol®), foram obtidos em um estudo clínico duplo-cego randomizado, controlado por placebo, em voluntários saudáveis. Nesse estudo, 28 fumantes saudáveis do sexo masculino foram suplementados diariamente, durante 8 semanas, com a dosagem de 200 mg do extrato; eles

apresentaram melhorias na saúde vascular, em comparação com o grupo controle (WESELER et al., 2011; WESELER; BAST, 2017).

Uma suplementação contendo o extrato de semente de uva (proantocianidinas oligoméricas OPCs originais de MASQUELIER®) e casca de *Pinus pinaster*, L. (MASQUELIER®), na proporção 50 / 50, foi administrada por atletas recreativos de meia maratona (que combinam exercícios extenuantes com 400 mg de ibuprofeno diariamente, e por isso, costumam apresentar redução do fluxo sanguíneo renal e danos renais). Essa suplementação reduziu a ocorrência de lesões renais, inflamação e estresse oxidativo, nos atletas suplementados (SEMEN et al., 2020).

Nesse trabalho utilizamos o extrato de semente de uva Masquelier® OPCs, fornecido pela I.N.C. Agency B.V. | Masquelier's.

3 METODOLOGIA

A metodologia engloba os aspectos éticos, o delineamento do estudo, a caracterização dos grupos (por sexo e por faixa etária, antes e depois da administração do extrato de semente de uva), os dados clínicos, e as técnicas utilizadas, bem como as análises estatísticas.

3.1 ASPECTOS ÉTICOS

Trata-se de um estudo clínico randomizado duplo-cego, incluindo indivíduos expostos à agrotóxicos de forma ocupacional. Os participantes receberam explicações a respeito do estudo e nos casos de aceite, o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO A) foi aplicado e assinado pelos participantes (que receberam uma cópia).

Em seguida, os participantes responderam a um questionário (ANEXO B), de acordo com os critérios de inclusão no estudo. As perguntas do questionário foram a respeito do uso de agrotóxicos, histórico de doenças de perfil inflamatório (pessoal e familiares de primeiro grau), doenças neurológicas (pessoal e familiares de primeiro grau), consumo de álcool e consumo de tabaco.

Este trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina, sob o número do parecer 3.127.656 (ANEXO C).

3.2 CASUÍSTICA

3.2.1 Desenho amostral

Esse estudo randomizado duplo-cego avaliou:

- Marcadores de instabilidade genômica e de danos de DNA por exposição à agrotóxicos; modulação nutrigenômica de danos ao DNA e instabilidade cromossômica, por suplementação do extrato de semente de uva;
- Modificações epigenéticas por exposição à agrotóxicos, através de perfis de miRNAs; modulação nutrigenômica por suplementação do extrato de semente de uva, através de perfis de miRNAs;
- Estresse oxidativo por exposição ocupacional à agrotóxicos; modulação nutrigenômica de estresse oxidativo por suplementação do extrato de semente de uva;
- Alterações imunológicas e toxicológicas por exposição ocupacional à agrotóxicos; modulação nutrigenômica de alterações imunológicas e toxicológicas, por suplementação do extrato de semente de uva.

Essas avaliações foram realizadas à partir da coleta de sangue periférico de agricultores do município de Santo Amaro da Imperatriz (SC). Foram incluídos inicialmente 85 indivíduos nesse estudo.

A coleta foi realizada nas mesmas pessoas em dois momentos: antes da administração do extrato de semente de uva Masquelier® OPCs (ou placebo), para análises em relação à exposição aos agrotóxicos, e novamente após 8 semanas da suplementação, para análises em relação ao extrato (ou placebo). Nessa segunda coleta, 8 pessoas não compareceram, sendo incluídos no estudo, portanto, 77 agricultores.

Cada participante foi orientado à administrar 2 cápsulas ao dia, juntas, em qualquer horário do dia, com água ou suco. Cada cápsula continha a dosagem de 100 mg (de extrato de semente de uva Masquelier® OPCs ou placebo, distribuídos aleatoriamente). As cápsulas que continham placebo eram compostas de celulose microcristalina e estearato de magnésio.

3.2.2 Critérios de inclusão e exclusão; seleção de participantes

Foram incluídos agricultores com histórico de exposição à agrotóxicos como atividade laboral há pelo menos 5 anos. Foram excluídas gestantes e lactantes, assim como menores de 18 anos. A seleção foi feita inicialmente através do contato com a coordenadora e as agentes de saúde do Posto de Saúde Nicolau Turnes (em Santo Amaro da Imperatriz – SC), com o apoio da Secretaria de Saúde do município. Essa cidade foi selecionada para a realização dessa pesquisa devido à intensa atividade agrícola da região, e a parceria entre a Universidade Federal de Santa Catarina e a Secretaria de Saúde do município, visto que outros projetos já foram anteriormente realizados entre ambas.

No decorrer das coletas, houve ainda outras formas de inclusão de participantes: indicações de pessoas pelos agricultores que estavam participando (parentes, vizinhos, amigos, colegas de trabalho) e o contato com o Sindicato dos Agricultores (tivemos o apoio do mesmo em também recrutar participantes, além de fornecer o seu espaço para coleta).

Dessa forma, algumas coletas foram realizadas no Posto de Saúde Nicolau Turnes, e outras no Sindicato dos Agricultores da cidade.

3.3 COLETAS, PROCESSAMENTO E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS

No contato com os agricultores foram oferecidos esclarecimentos à respeito da pesquisa, e aqueles que aceitaram participar, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Nas coletas de sangue feitas antes da administração do extrato, primeiramente os participantes responderam ao questionário (conforme item 3.1); nas coletas de sangue feitas depois da administração do extrato (ou placebo), confirmávamos a identidade do participante, e conversávamos com eles se tinham alguma dúvida, ou algo à relatar.

Foram coletados: 3 tubos de soro e 3 tubos de EDTA – para as análises toxicológicas, bioquímicas, imunológicas e miRNAs, além de 1 tubo de heparina – para as análises de danos ao DNA.

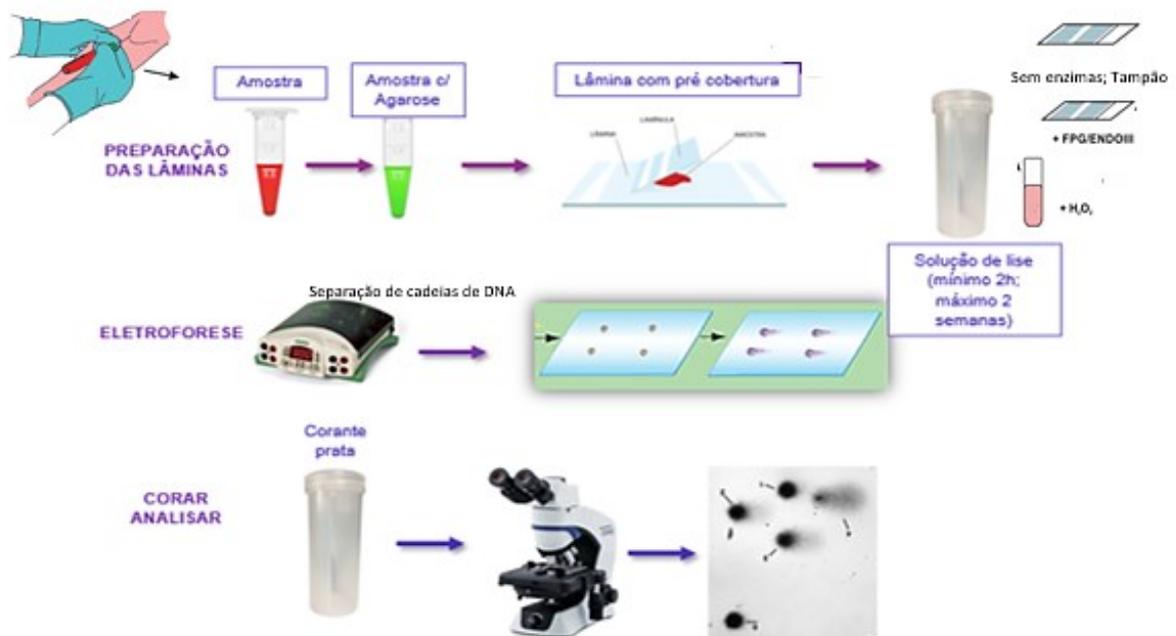
As amostras de sangue total para análises de danos ao DNA foram armazenadas à 4 °C e processadas conforme as Técnicas do ensaio cometa e Teste de micronúcleo com bloqueio da citocinese celular (CBMN).

3.4 DANO DE DNA E AVALIAÇÃO DE INSTABILIDADE GENÔMICA - ENSAIO COMETA

Esta técnica foi realizada conforme a descrita por Singh e colaboradores (1988) e adaptada por Tice e colaboradores (2000).

3.4.1 Preparação das lâminas

Figura 5 – Técnica do ensaio cometa.



Fonte: elaborado pela autora. Adaptado de Mišík et al., 2023.

A Figura 5 apresenta uma visão geral da técnica de eletroforese em gel de célula única para medir danos ao DNA, formação de bases oxidadas de DNA, reparo de DNA e sensibilidade química.

3.4.1.1 Lâminas sem enzimas

Para a Técnica do ensaio cometa foram confeccionadas lâminas com uma pré-cobertura de agarose de ponto de fusão normal (*Normal Melting Point* ou NMP). A agarose foi diluída em água, aquecida em forno de microondas e colocada em

cubetas nas quais as lâminas previamente lavadas foram mergulhadas, e um dos lados limpo com papel absorvente. Após essa etapa, foram deixadas em temperatura ambiente, e armazenadas em local seco.

Com as lâminas prontas para uso, a agarose de baixo ponto de fusão (*Low Melting Point* ou LMP) foi aquecida à 37 °C em banho-maria ou microondas; foi misturada com uma micropipeta 95 µl de agarose LMP e 5 µl de sangue heparinizado (dispostos sobre a lâmina com pré-cobertura de agarose NMP), a qual é imediatamente coberta por uma lamínula (para misturar as duas camadas e evitar a formação de bolhas de ar). O material foi colocado em uma câmara úmida em geladeira, horizontalmente para endurecimento da agarose (por 5 minutos), e após este período a lamínula foi cuidadosamente retirada.

Após esta etapa, a lâmina foi colocada em uma cubeta contendo solução de lise gelada (por um período mínimo de 2 horas e máximo de 2 semanas). A solução de lise é composta de 99 ml de solução de lise mãe (NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM) com 10 mL de DMSO e 1 mL de Triton x-100.

Após confecção e armazenamento das lâminas em cubeta com solução de lise gelada, algumas lâminas passaram ainda pelo processo de adição de enzimas. Nesse caso, o tampão 10 x (Hepes 400 mM, KCl 1 M, EDTA 5 mM, BSA 2 mg / ml, pH ajustado em 8,0 com KOH 5 M gelado), é retirado do freezer e descongelado em geladeira; seu volume é diluído para 10 x o seu volume inicial (com água mili-Q gelada, formando um tampão 1 x). Duas enzimas podem ser então utilizadas: Endonuclease III (endo III) ou FPG; para o preparo de lâminas com cada uma delas, no caso da endo III, é preparada primeiramente a solução A (com 1 µL de enzima e 999 µL do tampão 1 x), e a partir dela, é preparada a solução de uso (com 100 µL de solução A e 900 µL do tampão 1 x); para a FPG, é feito o mesmo processo, mas utilizando quantidades diferentes na solução de uso (200 µL de solução B, igual a solução A, mudando apenas a enzima utilizada, e 800 µL do tampão 1 x). As lâminas são retiradas da lise e lavadas 2 x por 5 minutos com o tampão 1 x, antes da incubação com as enzimas; sobre cada uma das lâminas, são colocados 60 µL da solução uso da enzima (endo III ou FPG), ou apenas o tampão (controle).

Para a eletroforese prepara-se um tampão (NaOH, EDTA 200 mM e água destilada em pH 10, e a 4 °C no momento do uso). As lâminas retiradas da lise são posicionadas sem brechas na cuba de eletroforese que ficará na geladeira, o tampão de eletroforese é adicionado e após 20 minutos a corrente é ligada (esse tempo de

contato das lâminas com o tampão é necessário para que haja a separação das cadeias de DNA, e assim possam migrar em direção ao ânodo). As condições da eletroforese são de 25 V e 300 mA (ajustado através do volume de tampão) por 20 minutos.

Após a corrida de eletroforese em célula única, as lâminas foram retiradas cuidadosamente da cuba e lavadas 3 vezes com tampão de neutralização (5 minutos entre cada lavagem). Logo em seguida as lâminas são lavadas 3 vezes com água destilada, e deixadas para secar por no mínimo 2 horas (à 37 °C).

Para a fixação do material, as lâminas são mergulhadas por 10 minutos em solução fixadora (ácido tricloroacético 15 %, sulfato de zinco heptahidratado 5 % e glicerol 5 %), lavadas 3 vezes com água destilada e colocadas para secar (por no mínimo 2 horas a 37 °C).

Para a coloração, as lâminas são re-hidratadas por 5 minutos em água destilada, as soluções A (carbonato de sódio 5 %) e B (nitrato de amônio 0,02 %, nitrato de prata 0,02 %, ácido tungstosilícico 0,1 %, formaldeído 0,05 %) e colocadas em cubetas contendo a solução de corante A + B (por aproximadamente 30 minutos com agitações a cada 5 minutos). Após atingir uma coloração acinzentada, as lâminas são lavadas com água destilada e colocadas na solução de parada (ácido acético 1 %) por 5 minutos e lavadas novamente com água destilada; depois disso, são deixadas em temperatura ambiente. Após secagem, as lâminas estarão prontas para análise.

Para cada eletroforese acrescenta-se ao menos uma lâmina de amostra tratada com H₂O₂ 10 µM para ser utilizada como controle positivo (seguindo os mesmos passos que as demais lâminas). São confeccionadas duas lâminas por indivíduo (conta-se 50 células em cada). As células são então observadas em microscópio óptico no aumento de 100 vezes. O DNA danificado migra durante a eletroforese, formando uma cauda no núcleo que corresponde à intensidade do dano, e classificados em cinco classes de dano (de 0 a 4), sendo classe 0 as células sem danos, classe 1 as células com danos mínimos, classe 2 as células com danos médios, classe 3 as células com danos intensos e classe 4 as células com danos máximos. Os valores de 0 a 4 dos 100 núcleos analisados são somados, o que resulta no valor individual (podendo variar de 0 a 400 unidades arbitrárias).

Ao todo, foram confeccionadas 8 lâminas por indivíduo: 2 lâminas sem enzimas; 2 lâminas endonuclease III; 2 lâminas FPG; 2 lâminas tampão.

3.4.1.2 Lâminas com enzimas

Após confecção e armazenamento das lâminas em cubeta com solução de lise gelada (conforme item 3.5.1.1), algumas lâminas passam ainda pelo processo de adição de enzimas. Nesse caso, o tampão 10 x (Hepes 400 mM, KCl 1 M, EDTA 5 mM, BSA 2 mg / ml, pH ajustado em 8,0 com KOH 5 M gelado), é retirado do freezer e descongelado em geladeira; seu volume é diluído para 10 x o seu volume inicial (com água mili-Q gelada, formando um tampão 1 x). Duas enzimas podem ser então utilizadas: Endonuclease III (endo III) ou FPG; para o preparo de lâminas com cada uma delas, no caso da endo III, é preparada primeiramente a solução A (com 1 µL de enzima e 999 µL do tampão 1 x), e a partir dela, é preparada a solução de uso (com 100 µL de solução A e 900 µL do tampão 1 x); para a FPG, é feito o mesmo processo, mas utilizando quantidades diferentes na solução de uso (200 µL de solução B, igual a solução A, mudando apenas a enzima utilizada, e 800 µL do tampão 1 x). As lâminas são retiradas da lise e lavadas 2 x por 5 minutos com o tampão 1 x, antes da incubação com as enzimas; sobre cada uma das lâminas, são colocados 60 µL da solução uso da enzima (endo III ou FPG), ou apenas o tampão (controle). A partir disso, são colocadas as lamínulas sobre as soluções e as lâminas são dispostas em câmara úmida, incubadas por 30 minutos. Finalizado esse tempo, as lâminas são retiradas, as lamínulas removidas, e é realizada a eletroforese.

Ao todo, foram confeccionadas 8 lâminas por indivíduo: 2 lâminas sem enzimas; 2 lâminas endo III; 2 lâminas FPG; 2 lâminas tampão. As lâminas sem enzimas e lâminas tampão identificam danos inespecíficos ao DNA; a enzima FPG identifica danos oxidativos específicos em purinas (Adenina e Guanina); e finalmente a enzima endonuclease III (endo III) detecta danos específicos em pirimidinas oxidadas (Timina e Citosina).

3.4.2 Eletroforese de célula única

Para a eletroforese prepara-se um tampão alcalino (NaOH, EDTA 200 mM e água destilada em pH 10), a 4 °C. As lâminas são então retiradas da lise, e posicionadas sem brechas na cuba de eletroforese. O tampão de eletroforese é

adicionado, no qual as lâminas ficam expostas por 20 minutos (esse tempo de contato das lâminas com o tampão é necessário para que haja a separação das cadeias de DNA, e assim possam migrar em direção ao ânodo). Em seguida, é realizada a eletroforese por 20 minutos em geladeira, sob as condições de 25 V e 300 mA (ajustado através do volume de tampão).

Após a corrida, as lâminas são retiradas cuidadosamente da cuba e lavadas 3 vezes com tampão de neutralização (Tris 0,4 M, pH 7,5), com 5 minutos de intervalo entre cada lavagem. Logo em seguida, as lâminas são lavadas 3 vezes com água destilada, e deixadas para secar por no mínimo 2 horas à 37 °C.

Para a fixação do material, as lâminas são mergulhadas por 10 minutos em solução fixadora (ácido tricloroacético 15 %, sulfato de zinco hepta hidratado 5 % e glicerol 5 %), lavadas 3 vezes com água destilada, e colocadas para secar por no mínimo 2 horas à 37 °C.

Para cada eletroforese é acrescentada ao menos uma lâmina de amostra tratada com H₂O₂ 10 µM, para ser utilizada como controle positivo (seguindo os mesmos passos que as demais lâminas).

3.4.3 Coloração das lâminas

As lâminas são coradas seguindo o método de coloração de prata, descrito por Nadin e colaboradores (2001). Para a coloração, as lâminas são reidratadas por 5 minutos em água destilada. A mistura das soluções A (carbonato de sódio 5 %) e B (nitrito de amônio 0,02 %, nitrato de prata 0,02 %, ácido tungstosilícico 0,1 %, formaldeído 0,05 %) é feita imediatamente antes do uso. As lâminas são colocadas em cubetas contendo a solução de corante A + B por aproximadamente 15 minutos, com agitações a cada 5 minutos. Após atingir uma coloração acinzentada, as lâminas são lavadas com água destilada e colocadas na solução de parada (ácido acético 1 %) por 5 minutos, lavadas novamente com água destilada e depois deixadas em temperatura ambiente. Após secagem, as lâminas são armazenadas em caixas, em local fresco e seco, em temperatura ambiente, até as análises (leitura das lâminas).

3.4.4 Leitura das lâminas

Considerando as oito lâminas confeccionadas pra cada participante do estudo, são analisadas 50 células em cada lâmina. Para a análise cega pelo observador, as identificações de cada participante do estudo são codificadas e numeradas. Cada agricultor recebeu a identificação Ex (extrato), e um número, conforme a ordem de aplicação do questionário. Por exemplo, o participante número 1 do estudo, recebeu a identificação Ex 01, e assim, sucessivamente. Além disso, como cada indivíduo teve duas coletas de sangue, uma antes (AE) e outra depois (D) da administração do extrato (ou do placebo), o mesmo indivíduo recebeu duas identificações: Ex 01 AE e Ex 01 D. Dessa forma, cada indivíduo teve 8 lâminas a serem analisadas antes da administração do extrato ou placebo, e mais 8 lâminas a serem analisadas depois da administração.

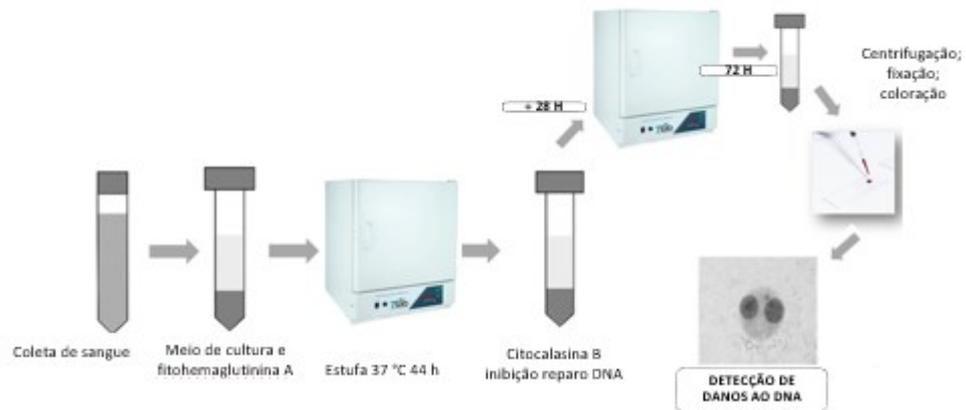
As células foram observadas em microscópio óptico, em duplicata, no aumento de 200 vezes. Regiões próximas às margens da lâmina ou bolhas de ar foram evitadas (devido a possibilidade de a migração ser prejudicada nestes locais).

A intensidade do dano de DNA foi classificada em 4 classes, sendo 0 = ausência de dano; 1 = células com dano mínimo; 2 = células com danos médios; 3 = células com danos intensos; e 4 = células com danos máximos, conforme demonstrado na Figura 7, item 4.4.1. Os valores de 0 a 4 dos 100 núcleos analisados são somados, o que resulta no valor individual, podendo variar de 0 a 400 unidades arbitrárias.

3.5 DANO DE DNA E AVALIAÇÃO DE INSTABILIDADE GENÔMICA - TÉCNICA DE MICRÔNÚCLEO COM BLOQUEIO DE CITOCINESE CELULAR (CBMN)

Esta técnica foi adaptada do protocolo publicado por Fenech em 2007.

Figura 6 – Técnica de Micronúcleo com bloqueio de citocinese celular



Fonte: elaborado pela autora. Adaptado de Wang et al., 2022.

A Figura 6 apresenta uma visão geral do ensaio de micronúcleo com bloqueio de citocinese celular para medir danos ao DNA.

3.5.1 Cultura celular

Para a técnica de CBMN são adicionadas aproximadamente 10 gotas de sangue total heparinizado em um tubo contendo 4 ml de meio de cultura do tipo RPMI, 1 ml de soro bovino fetal e 100 µl de fitohemaglutinina A, e em seguida colocado em estufa (à 37 °C). Após 44 horas de cultura, são adicionados 6 µg de citocalasina B por ml de cultura, que permanece mais 28 horas em estufa. Ao final das 72 horas, o tubo com a cultura é centrifugado a 1500 rpm durante 6 minutos e o sobrenadante descartado, seguindo com a adição lenta de 5 ml de uma solução hipotônica aquecida à 37 °C de KCL 0,075 M (age por 7 minutos). Em seguida, adicionado 0,5 ml de solução fixadora de metanol e ácido acético (3:1) e homogeneizado; após nova centrifugação, o sobrenadante é descartado e são adicionados 5 ml de solução fixadora lentamente (o material permanece na geladeira por no mínimo 10 minutos). Após este período, é realizada uma lavagem das hemácias com centrifugações seguidas, e adição de solução fixadora até que o sobrenadante tenha se tornado límpido. No último descarte, aproximadamente 1 ml do sobrenadante é mantido no tubo e é feita a ressuspensão do material. Duas a quatro gotas do material resultante são dispostas em duas lâminas previamente lavadas, e colocadas no congelador. A coloração das lâminas é realizada com Giemsa 5 %.

A análise das lâminas é realizada em microscópio óptico, contando o índice mitótico em 500 células (presença de células mononucleadas, binucleadas, trinucleadas, tetranucleadas), apoptóticas e necróticas. Os eventos de micronúcleos

(MNs), *buds* nucleares e pontes nucleoplasmáticas, são contados após a análise de 1000 linfócitos binucleados.

3.5.2 Preparação das lâminas

Para confecção das lâminas foi realizada uma lavagem das hemácias com centrifugações, seguidas da adição de solução fixadora até que o sobrenadante se tornasse límpido. No último descarte, aproximadamente 1 ml do sobrenadante foi mantido no tubo e ressuspendido.

Duas a quatro gotas do material resultante foram dispostas em uma lâmina. Esta lâmina foi previamente lavada com álcool à 70 %, e deixadas no congelador por alguns minutos, para formar uma camada de gelo e permitir que o material se espalhasse.

Foram confeccionadas duas lâminas por participante. Após secagem à temperatura ambiente, as lâminas foram coradas com solução de giemsa 10 % por 8 minutos.

3.5.3 Leitura das lâminas

A análise das lâminas foi realizada em microscópio óptico (Zeiss Axio Scope A1) no aumento de 200 vezes e para a confirmação das estruturas em 1000 vezes. As lâminas foram analisadas de maneira cega por um único observador e em duplicatas.

As frequências de MNs, NBUDs e NPNPs (Figura 12, item 4.4.2) foram contadas após a análise de 1000 linfócitos binucleados (500 células em cada lâmina por amostra). O índice mitótico (IDN) foi avaliado em 500 células (250 células em cada lâmina por amostra), que consiste na presença de células mononucleadas, binucleadas, trinucleadas, tetranucleadas, apoptóticas e necróticas. O cálculo do IDN foi obtido pela fórmula $IDN = (M1 + (2 \cdot M2) + (3 \cdot M3) + (4 \cdot M4)) / N$, onde M1 a M4 representa o número de células com 1 a 4 núcleos respectivamente, enquanto N é o número total de células viáveis (excluindo as células com necrose e apoptose).

3.6 ESTRESSE OXIDATIVO

3.6.1 Imunoensaio enzimático

As concentrações de OxLDL (LDL oxidada), PC (Proteína Carbonilada), GPx (Glutathione peroxidase), IL-6 (Interleucina 6) e TNF- α (Fator de necrose tumoral alfa) dos participantes do estudo foram analisadas nas amostras de soro através de um conjunto diagnóstico de imunoensaio enzimático (ELISA) do tipo sanduíche. Previamente às análises, as amostras de soro foram centrifugadas a 1.107 g por 10 minutos a 21 °C e analisado apenas o sobrenadante, etapa sugerida pelo fabricante com o intuito de eliminar possíveis interferentes. As concentrações de OxLDL, PC, GPx, IL-6 e TNF- α foram determinados nas amostras de soro de acordo com as instruções do fabricante, MyBioSource (San Diego, Califórnia, EUA) para OxLDL, PC e GPx e R&D Systems (Kit DuoSet; Quantikine, Minneapolis, MN, EUA) para IL-6 e TNF- α . A sensibilidade do ensaio foi de 12 pg/mL para OxLDL, 0,1 ng/mL para PC, 18,75pg/mL para GPx, 9,38 pg/mL para IL-6 e 15,6 pg/mL para TNF- α .

Para a análise dos dados, uma curva padrão foi criada traçando a absorbância média para cada padrão no eixo y com a concentração no eixo x e desenhando uma curva de melhor ajuste através de oito pontos no gráfico. Por meio da equação da reta, foi possível calcular a concentração de cada amostra.

3.6.2 Ensaio colorimétrico

As análises das concentrações de MDA (peroxidação lipídica), MPO (Mieloperoxidase) e GSH (glutathione redutase) foram realizadas através de ensaios colorimétricos de acordo com as instruções dos fabricantes, Sigma-Aldrich (San Luis, Missouri, EUA) para MDA e MPO e Invitrogen (Waltham, Massachusetts, EUA) para GSH.

Para a análise dos dados, uma curva padrão foi criada traçando a absorbância média para cada padrão no eixo y com a concentração no eixo x e desenhando uma curva de melhor ajuste através de oito pontos no gráfico. Por meio da equação da reta, e do cálculo previamente estabelecido pelo kit diagnóstico, foi possível calcular a concentração de cada amostra.

3.7 ALTERAÇÕES IMUNOLÓGICAS; IMUNOFENOTIPAGEM - ANÁLISE DA CELULARIDADE E PERFIL LEUCOCITÁRIO DO SANGUE PERIFÉRICO (SP)

A análise da celularidade e perfil leucocitário das amostras para os agricultores avaliados foi realizada por citometria de fluxo. O painel de anticorpos utilizados está representado no Quadro 1 e foi elaborado com base no painel desenvolvido por van Dongen e colaboradores, denominado Lymphoid Screening Tube (LST) (VAN DONGEN et al., 2012).

Para a marcação das amostras, foram utilizados 300 µL de SP, que foram lavados por três vezes com 10 mL de solução tampão fosfato salina (PBS), por 5 minutos a 540 x g. Ao fim da terceira centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspensionado em 150 µL de PBS. O precipitado foi então transferido para um tubo de citômetro, onde foram adicionados os anticorpos de interesse e a amostra foi incubada por 30 minutos em temperatura ambiente, na ausência da luz. Após o período de incubação, foram adicionados 2 mL de solução lisante de hemácias (BD FACS; *Lysing Solution*) e a amostra foi incubada novamente, em ambiente escuro, por 15 minutos.

Após o processo de hemólise, a amostra foi centrifugada por 5 minutos a 540 x g, o sobrenadante foi descartado e a amostra foi centrifugada novamente com 2 mL de PBS por 5 minutos a 540 x g. Ao término da centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensionado em 500 µL de PBS. Para a análise, foram adquiridos 200 mil eventos totais no citômetro FACS Canto II equipado com o software FACSDiva versão 8 (BD *Biosciences*) e a análise do perfil leucocitário foi realizada pelo software Infinicyt versão 2.0 (Cytognos).

A estratégia de *gating* utilizada para a seleção das subpopulações leucocitárias foi realizada conforme descrito por Cardoso & Santos-Silva (2019).

Quadro 1 - Painel de anticorpos utilizado no estudo.

PacB/BV421	PacO	FITC	PE	PerCP-Cy5-5	PE-Cy7	APC	APCH7
CD20/CD4	CD45	CD8/Lambda	CD56/Kappa	CD5	CD19/TCRγδ	CD3	CD38

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

3.8 ALTERAÇÕES TOXICOLÓGICAS

A análise foi adaptada à partir da metodologia proposta por Worek et al., 1999. Na primeira etapa a acetilcolina é hidrolisada pela AChE, formando acetato e tiocolina; na segunda etapa, a tiocolina reage com o íon 5:5-ditiobisnitrobenzoato (DTNB – um reagente de cor), para produzir o ânion amarelo 5-tio-2-nitro-benzoico (TNB). A coloração é medida em absorbância em espectrofotômetro UV-1800 no comprimento de onda de 436 nm. Esse ensaio determina a atividade da AChE em amostras de sangue por exposição ocupacional a agrotóxicos inibidores de colinesterase (organofosforados e carbamatos), além de suspeita de tentativa de suicídio.

O sangue é colhido com EDTA ou heparina; pode ser feita em qualquer horário do dia sem necessidade de preparação especial do paciente. Deve ser armazenado em geladeira por no máximo 6 dias.

A determinação da atividade de AChE deve ser feita em espectrofotômetro, com temperatura de 37 °C. cada controle deve ser feito em triplicata, concomitantemente a análise da amostra biológica, também em triplicata. Os valores de referência são 352 – 779 U / mmol Hb.

As análises de BuChE são feitas da mesma forma descritas para a AChE.

3.9 ANÁLISE DE MICRO RNAS

Coleta e processamento das amostras de soro - O sangue foi centrifugado a 820 ×g por 10 min para obtenção do soro. As amostras de soro foram transferidas para microtubos e armazenadas a -80 °C. Para os experimentos, o soro foi descongelado e centrifugado a 16000 ×g por 10 min a 4 °C. Esta etapa permitiu a remoção de células e crioprecipitados.

Extração de RNA total - O RNA total foi extraído de acordo com as instruções do kit mirVana™ PARIS™ RNA (AM1556, Ambion; Life Technologies, Austin, TX, EUA). A extração foi iniciada a partir da adição de 500 µL de uma solução desnaturante em 500 µL de soro, seguido de agitação vigorosa e incubação em gelo por 5 min. Em seguida foi adicionado ácido-fenol: clorofórmio para separação da fase orgânica e aquosa. As amostras foram agitadas em vórtex e centrifugadas a 12000 ×g por 5 min. Após esta etapa, 500 µL de RNA, que se encontra na fase superior aquosa, foram transferidos para um novo microtubo. Subsequentemente foi adicionado etanol absoluto (Merck, Massachusetts, EUA) para precipitação dos ácidos nucleicos. Esta mistura, etanol e RNA, foi adicionada em uma coluna com filtro de

sílica que retém o RNA total enquanto que o material filtrado é descartado. Na sequência, foram realizadas as etapas de lavagem e o RNA foi eluído com água livre de RNase. As amostras foram mantidas em freezer -80 °C até utilização.

Detecção de microRNAs por microarranjo - Para a avaliação do perfil de miRNAs nas amostras de soro dos pacientes foram utilizadas lâminas de microarranjo, G3 Human miRNA Microarray, Release 21 (Agilent Technologies, Califórnia, EUA) contendo oito regiões com 2549 sequências de miRNAs humanos. Os ensaios foram realizados conforme instruções do fabricante. Primeiramente, 35 µL de RNA foi concentrado em *SpeedVac*TM Concentrator Savant (Thermo Fisher Scientific) à temperatura ambiente. Após esta etapa, foram adicionados 2 µL de água livre de RNase em cada amostra de RNA concentrado. Em seguida, foi realizada a etapa de desfosforilação, e para isso, foram adicionados sobre a amostra 2 µL do Mix contendo 0,4 µL de tampão, 1,1 µL *Spike-In* de marcação e 0,5 µL da enzima fosfatase. A mistura foi incubada em termobloco (Biocycler) a 37 °C por 30 min. Em seguida, as amostras foram desnaturadas com adição de 2,8 µL de DMSO, incubadas a 100 °C por 7 min e após, mantidas em banho de água e gelo. Na próxima etapa, foi preparado o Mix para ligação da Cianina, contendo os seguintes reagentes por amostra: 1µL do tampão; 3 µL de Cianina-3 e 0,5 µL da enzima T4 RNA Ligase. O Mix (4,5 µL) foi adicionado sobre as amostras e logo em seguida, foram incubadas a 16 °C por 2 h. Decorrido o tempo de incubação, as amostras foram completamente secas em *SpeedVac*TM Concentrator com aquecimento de 50 °C, por 3 h e pressão de aproximadamente 10 Torr. As amostras completamente secas foram armazenadas a -80 °C. No dia seguinte, as amostras foram solubilizadas em 17 µL de água livre de RNase. Assim, sobre os 17 µL de amostras, foram pipetados: 1µL do *Spike-In* de hibridização, 4,5 µL do agente de bloqueio e 22,5 µL de tampão. As amostras foram misturadas gentilmente, incubadas a 100 °C por 5 min e imediatamente transferidas para banho de água e gelo por 5 min. A câmara de hibridização contendo uma lâmina para aplicação de amostra foi montada e foram pipetados 45 µL de amostra sobre essa lâmina. A lâmina contendo os miRNAs impressos foi colocada em contato com a amostra e em seguida foram levadas a um forno de hibridização com temperatura a 55 °C, rotação de 20 rpm, por 20 h. Transcorrida a etapa de hibridização, a lâmina foi lavada com tampões (WASH BUFFER 1 e 2, Agilent Technologies, Califórnia, EUA). Logo em seguida, as lâminas foram colocadas em um suporte para serem analisadas

no equipamento SureScan Microarray Scanner (Agilent Technologies, Califórnia, EUA). Os dados foram extraídos com o auxílio do programa *Feature Extraction* (Agilent Technologies, Califórnia, EUA) e os arquivos gerados foram submetidos ao software Genepring (Agilent Technologies, Califórnia, EUA) para avaliação dos miRNAs alterados. Os experimentos de microarranjo foram realizados sem réplicas técnicas ou biológicas.

PCR quantitativo - As reações de poliadenilação, transcrição reversa (RT) e reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR), foram realizadas utilizando o Kit miRNA RT-qPCR Master Mix Detection (600584, Agilent Technologies, Califórnia, EUA). Primeiramente, 30 μL de RNA foram concentrados em *SpeedVac™ Concentrator* durante 1 h. Em seguida, o RNA foi ressuspensionado em 14 μL de água livre de RNase e foram adicionados 4 μL de tampão, 1 μL de rATP (10 mM) e 1 μL da enzima poliA polimerase. Após, as amostras foram incubadas em termociclador *Veriti™* (Applied Biosystems, Foster, Califórnia, EUA) a 37 °C durante 30 min e 95 °C por 5 min. Em seguida, para síntese de cDNA, foram adicionados os seguintes componentes em 4 μL de RNA poliadenilado: 2 μL de tampão, 0,8 μL de dNTP, 1 μL do iniciador adaptador, 1 μL da enzima *AffinityScript RT/RNase* e 11,2 μL de água livre de RNAase. As amostras foram novamente incubadas no termociclador com o seguinte programa: 55 °C por 5 min, 25 °C por 15 min, 42 °C por 30 min e 95 °C por 5 min. Em seguida, as amostras de cDNA foram armazenadas a -80 °C até a realização da qPCR.

Os iniciadores específicos de cada miRNA foram desenhados conforme recomendado no protocolo do kit. Foram desenhados iniciadores para avaliação da expressão de hsa-miR-4516, hsa-miR-8069, hsa-miR-223-3p, hsa-miR-21-5p, has-miR-3960, has-miR-16-5p, has-miR-451a, has-miR-6090, hsa-miR-33b-3p e hsa-miR-6089. A qPCR foi realizada utilizando 1 μL de cDNA (diluído 1:5); 12,5 μL de master mix (miRNA qPCR master mix, 600583, Agilent Technologies, Califórnia, EUA); 0,375 μL de corante de referência passiva ROX (diluído 1:50); 1 μL do iniciador universal antisense (3,125 μM); 1 μL do iniciador senso específico para o miRNA e 9,125 μL de água livre de RNase. A qPCR foi realizada com o seguinte programa: 95 °C por 10 min; 40 ciclos de 95 °C por 10 s (desnaturação), temperatura de anelamento por 15 s (anelamento) e 72 °C por 20 s (extensão). Por fim, foi realizada uma curva de dissociação a 95 °C por 1 min; temperatura de anelamento por 30 s e 95 °C por 1 min.

Os experimentos foram realizados em duplicatas técnicas e os resultados foram reportados como expressão relativa calculada por $2^{-\Delta\Delta Cq}$ conforme descrito por Livak e Schmittgen (2001) utilizando o miR-16-5p como controle endógeno.

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov – Realizado nas amostras dos 2 grupos AE (grupo placebo e grupo extrato); nas amostras dos grupos D (grupo placebo e grupo extrato). Para as variáveis idade, tempo de trabalho, IMC, ensaio cometa (total; tampão; FPG; endo III), CBMN (MN; NPNP; NBUD; apoptose; necrose), AChE e BuChE. Também foi a análise estatística utilizada para GPx, T CD4, T CD4 / T CD8, e a relação neutrófilos / linfócitos.

Tanto no grupo placebo quanto no grupo extrato, antes da intervenção (AE), as variáveis idade, tempo de trabalho, IMC, ensaio cometa (endo III; tampão), índice mitótico, AChE e T CD4 apresentaram distribuição normal ($p > 0,05$). Já as variáveis ensaio cometa (total e FPG), (necrose; apoptose; MN; NPNP; NBUD), BuChE, GPx, T CD4 / T CD8, e a relação neutrófilos / linfócitos apresentaram distribuição não paramétrica ($p < 0,05$).

Depois da intervenção (D), no grupo extrato – distribuição normal ($p > 0,05$): ensaio cometa (endo III), índice mitótico, MN, AChE, BuChE, a relação T CD4 / T CD8, e a e a relação neutrófilos / linfócitos; distribuição não paramétrica ($p < 0,05$): ensaio cometa (total; FPG; tampão), necrose, apoptose, NPNP, NBUD, GPx, T CD4.

Depois da intervenção (D), no grupo placebo – distribuição normal ($p > 0,05$): ensaio cometa (endo III; FPG; tampão), AChE, BuChE, T CD4; distribuição não paramétrica ($p < 0,05$): ensaio cometa (total), índice mitótico, necrose, apoptose, MN, NPNP, NBUD, GPx, a relação T CD4 / T CD8, e a relação neutrófilos / linfócitos.

Teste estatístico de Wilcoxon – Nas comparações antes (AE) e depois (D) no grupo extrato. Para a frequência de danos no ensaio cometa (total; endo III; FPG; tampão). Para a frequência de danos no CBMN (índice mitótico; necrose; apoptose; frequência de MN, pontes e buds). Para linfócitos T CD4 e a relação T CD4 / T CD8. Para a relação neutrófilos / leucócitos. Para GPx.

Correlação de Spearman - distribuição não paramétrica ($p < 0,05$): Para o teste de correlações entre o grupo extrato. Antes da intervenção e depois da intervenção.

MicroRNAs: Para as análises provenientes da técnica de microarranjo foram utilizados os programas *Genespring GX* (Agilent Technologies, Califórnia, EUA) e *GraphPad Prism 8* para análise dos resultados. A análise de normalidade foi realizada utilizando o teste de Kolmogorov-Smirnov. Foram considerados apenas miRNAs com *Fold Change* (FC) (razão de expressão entre os grupos para cada miRNA) ≥ 2 e com valores de $p < 0,05$. Os miRNAs com expressão alterada foram identificados pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney com correção de Benjamini-Hochberg. Para os resultados gerados na RT-qPCR, a normalidade da distribuição das variáveis foi também avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. As variáveis numéricas com distribuição normal foram comparadas pelo teste t de *Student* e o teste de *Mann-Whitney* foi utilizado nos casos de distribuição não-normal.

4 RESULTADOS

Por se tratar de um estudo randomizado duplo-cego placebo controlado, primeiramente foram realizadas análises com os grupos placebo e extrato juntos, em uma amostra única.

Depois disso, foram feitas novas análises, que fazem parte dos objetivos desse trabalho, com separação de grupos – placebo (0) e extrato (1).

O grupo extrato foi então comparado antes e depois da intervenção.

4.1 PERFIL DA POPULAÇÃO ESTUDADA

4.1.1 Dados das coletas e do perfil dos agricultores

Todas as coletas de sangue realizadas estão de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1: Dados referentes às coletas de sangue dos agricultores.

Data da coleta AE	n° de participantes e código das amostras	Data da coleta D	n° e identificação de participantes que não realizou a coleta D
20/09/2021	n = 10 (EX 01 – EX 10)	16/11/2021	n = 2 EX 06; EX 08
27/09/2021	n = 08 (EX 11 – EX 18)	22/11/2021	0
04/10/2021	n = 10 (EX 19 – EX 28)	29/11/2021	0
18/10/2021	n = 03 (EX 29 – EX 31)	13/12/2021	0
25/10/2021	n = 17 (EX 32 – EX 48)	20/12/2021	0
08/11/2021	n = 09 (EX 49 – EX 57)	04/01/2022	0
16/11/2021	n = 02 (EX 58 – EX 59)	10/01/2022	n = 1 EX 58
22/11/2021	n = 04 (EX 60 – EX 63)	17/01/2022	n = 1 EX 63
29/11/2021	n = 04 (EX 64 – EX 67)	24/01/2022	n = 2 EX 64; EX 67
12/12/2021	n = 18 (EX 68 – EX 85)	07/02/2022	n = 2 EX 77; EX 78

AE = antes da administração do extrato ou placebo; D = depois da administração do extrato ou placebo.

Foram realizadas 17 coletas (considerando as coletas antes da administração do extrato ou placebo, e as coletas feitas depois da suplementação).

O número inicial foi de 85 participantes no estudo. Contudo, 8 pessoas não compareceram para a coleta feita depois da suplementação (uma mulher e sete homens).

Sendo assim, atingimos um número de 77 participantes que realizaram as duas coletas de sangue: uma antes e a outra depois da administração do extrato ou placebo (22 mulheres e 55 homens).

Os agricultores receberam as cápsulas de acordo com o seu sexo e a sua faixa etária (Tabela 2). Os potes de cápsulas (contendo extrato ou placebo), estavam divididos em 6 caixas: 3 femininas e 3 masculinas (separadas em faixas etárias: de 18 a 45 anos; de 46 a 60 anos; acima de 60 anos). Como se trata de um estudo duplo-cego, a informação de qual agricultor utilizava extrato e qual utilizava placebo, era desconhecida.

Tabela 2: Dados referentes ao perfil dos agricultores, divididos em grupos (de acordo com o sexo e a faixa etária).

GRUPO (sexo e idade)	Coleta AE	Coleta D	Desistências
1) Feminino 18 - 45	8	8	-
2) Feminino 46 - 60	10	9	1
3) Feminino 60 +	5	5	-
4) Masculino 18 - 45	21	18	3
5) Masculino 46 - 60	29	25	4
6) Masculino 60 +	12	12	-
Total	85	77	8

AE = antes da administração do extrato ou placebo; D = depois da administração do extrato ou placebo.

4.2 DADOS CLÍNICOS

4.2.1 EXPOSIÇÃO À AGROTÓXICOS

Os dados referentes ao tempo de exposição dos agricultores aos agrotóxicos estão na Tabela 3.

Dos 77 agricultores incluídos no estudo, a exposição à agrotóxicos se dá da seguinte maneira: 7 agricultores têm até 9 anos de exposição (2 homens e 5

mulheres); de 10 a 15 anos de exposição são 10 agricultores (8 homens e 2 mulheres); 5 agricultores têm de 16 a 20 anos de exposição (3 homens e 2 mulheres); de 21 a 30 anos de exposição são 8 agricultores (7 homens e 1 mulher); e os que têm mais de 30 anos de exposição à agrotóxicos são 47 agricultores (35 homens e 12 mulheres).

Tabela 3: Tempo de exposição dos agricultores à agrotóxicos, de acordo com o sexo dos participantes.

Tempo de exposição	Homens	Mulheres
5 a 9 anos	2	5
10 a 15 anos	8	2
16 a 20 anos	3	2
21 a 30 anos	7	1
Mais de 30 anos	35	12

4.2.1.1 Classes de agrotóxicos utilizados e dados do plantio

De acordo com o questionário aplicado, todos os participantes relataram estar expostos à diversos agrotóxicos. Todos os participantes do estudo estão expostos à misturas de agrotóxicos, visto que trabalham todos os dias com diversos produtos químicos.

Nenhum participante respondeu apenas um nome comercial; como se trata de uma pequena região e muitos deles trabalham juntos, direta ou indiretamente, os agrotóxicos utilizados são praticamente os mesmos. Ao realizar a consulta na bula dos nomes comerciais relatados, as classes mais utilizadas estão de acordo com a Tabela 4.

A extensa maioria dos agrotóxicos utilizados são inseticidas e fungicidas. A classe de herbicidas também é utilizada. Um ativador vegetal também foi bastante citado, mas trata-se de um composto rico em minerais para enriquecimento do solo.

Os agricultores entrevistados plantam basicamente os mesmos itens: tomate, vagem, abobrinha, pimentão e milho na grande maioria. Plantam e colhem (e conseqüentemente, utilizam agrotóxicos), durante o ano todo, em torno de 2 horas por dia, 5 dias da semana (de segunda à sexta-feira).

Tabela 4: Exposição dos agricultores à agrotóxicos, de acordo com a classe de agrotóxico utilizado.

Classe do agrotóxico	Nomes comerciais citados
Inseticida	Karate; decis; vertimec; durivo; lannate; engeoplano; avatar; polytrin; klorpan
Fungicida	Ridomil; cercobin; bravomil; amistar; infinito; score; manzate; cimox
Herbicida	Round up
Outro	Titanium (ativador vegetal)

4.2.1.2 Cuidados na aplicação, modo de aplicação e uso de equipamentos de proteção individual (EPIs)

De acordo com a Tabela 5, alguns dos agricultores participantes do estudo têm o hábito de utilizar EPIs (11 mulheres x 30 homens), enquanto outros não utilizam (11 mulheres x 25 homens).

Tabela 5: Uso de equipamentos de proteção individual (EPIs), de acordo com o sexo e a faixa etária.

GRUPO (sexo e idade)	Usa EPIs	Não usa EPIs
1) Feminino 18 - 45	6	2
2) Feminino 46 - 60	2	7
3) Feminino 60 +	3	2
4) Masculino 18 - 45	10	8
5) Masculino 46 - 60	14	11
6) Masculino 60 +	6	6

Alguns agricultores incluídos no estudo aplicam os agrotóxicos com pulverizador costal (11 mulheres x 39 homens); outros aplicam com máquina (3 mulheres x 16 homens); e outros auxiliam outro trabalhador na aplicação (8 mulheres), conforme a Tabela 6.

Tabela 6: Modo de aplicação dos agrotóxicos, de acordo com o sexo e a faixa etária.

GRUPO (sexo e idade)	Pulverizador costal	Máquina	Auxilia na aplicação
1) Feminino 18 - 45	3	-	5
2) Feminino 46 - 60	6	2	1
3) Feminino 60 +	2	1	2
4) Masculino 18 - 45	11	7	-
5) Masculino 46 - 60	18	7	-
6) Masculino 60 +	10	2	-

Em relação aos hábitos de higiene após a aplicação dos pesticidas, 9 mulheres e 23 homens lavam as mãos após a aplicação; 8 mulheres e 27 homens tomam banho; enquanto 5 mulheres e 5 homens seguem normalmente as suas atividades após o uso laboral dos produtos químicos, conforme a Tabela 7.

Tabela 7: Cuidados após a aplicação dos agrotóxicos, de acordo com o sexo e a faixa etária.

GRUPO (sexo e idade)	Lava as mãos	Toma banho	Segue as atividades
1) Feminino 18 - 45	2	4	2
2) Feminino 46 - 60	3	3	3
3) Feminino 60 +	4	1	-
4) Masculino 18 - 45	8	9	1
5) Masculino 46 - 60	12	11	2
6) Masculino 60 +	3	7	2

4.2.2 Consumo de álcool e fumo

Os dados referentes à esse perfil estão de acordo com a Tabela 8.

Tabela 8: Consumo de álcool e fumo, de acordo com o sexo e a faixa etária.

GRUPO (sexo e idade)	Tempo de consumo de álcool	Tempo de consumo de cigarro	Ex fumante
1) Feminino 18 - 45	Menos de 10 anos = 2 10 a 20 anos = 1 Mais de 20 anos = 2 Não consome = 3	Menos de 10 anos = - 10 a 20 anos = - Mais de 20 anos = - Não consome = 8	Sim = 1 Não = 7
2) Feminino 46 - 60	Menos de 10 anos = - 10 a 20 anos = - Mais de 20 anos = 7 Não consome = 2	Menos de 10 anos = - 10 a 20 anos = - Mais de 20 anos = - Não consome = 9	Sim = 3 Não = 6
3) Feminino 60 +	Menos de 10 anos = - 10 a 20 anos = - Mais de 20 anos = - Não consome = 5	Menos de 10 anos = - 10 a 20 anos = - Mais de 20 anos = - Não consome = 5	Sim = - Não = 5
4) Masculino 18 - 45	Menos de 10 anos = 5 10 a 20 anos = 7 Mais de 20 anos = 4 Não consome = 2	Menos de 10 anos = 1 10 a 20 anos = - Mais de 20 anos = - Não consome = 17	Sim = - Não = 18
5) Masculino 46 - 60	Menos de 10 anos = - 10 a 20 anos = 1 Mais de 20 anos = 22 Não consome = 2	Menos de 10 anos = - 10 a 20 anos = - Mais de 20 anos = 3 Não consome = 22	Sim = 4 Não = 21
6) Masculino 60 +	Menos de 10 anos = - 10 a 20 anos = - Mais de 20 anos = 9 Não consome = 3	Menos de 10 anos = - 10 a 20 anos = - Mais de 20 anos = 3 Não consome = 9	Sim = 4 Não = 8

Em relação ao consumo de álcool, dos 77 agricultores incluídos no estudo, 12 mulheres e 48 homens ingerem bebidas alcoólicas, enquanto 10 mulheres e 7 homens não consomem. Já em relação ao consumo de tabaco, nenhuma mulher fuma, mas 4 são ex-fumantes; 7 homens fumam, enquanto 48 homens são não fumantes, sendo que 8 deles são ex-fumantes.

4.2.3 Histórico clínico (pessoal e de familiares): doenças sistêmicas de perfil inflamatório; doenças neurológicas

Os dados referentes ao histórico clínico dos agricultores e de seus familiares, incluindo doenças sistêmicas de perfil inflamatório e doenças neurológicas, estão na Tabela 9.

Tabela 9: Histórico clínico (pessoal e de familiares) – doenças sistêmicas de perfil inflamatório e doenças neurológicas, de acordo com o sexo e a faixa etária.

GRUPO (sexo e idade)	Doença sistêmica de perfil inflamatório	Doença sistêmica de perfil inflamatório Em parente de 1° grau	Depressão; ansiedade Doença neurológica	Depressão; ansiedade Doença neurológica Em parente de 1° grau
1) Feminino 18 - 45	Não tem = 5 1 a 3 doenças = 3 4 ou mais doenças = -	Não tem = 2 1 a 3 doenças = 6 4 ou mais doenças = -	Não tem = 2 1 a 3 doenças = 6 4 ou mais doenças = -	Não tem = 4 1 a 3 doenças = 4 4 ou mais doenças = -
2) Feminino 46 - 60	Não tem = 4 1 a 3 doenças = 5 4 ou mais doenças = -	Não tem = 2 1 a 3 doenças = 7 4 ou mais doenças = -	Não tem = 1 1 a 3 doenças = 8 4 ou mais doenças = -	Não tem = 6 1 a 3 doenças = 3 4 ou mais doenças = -
3) Feminino 60 +	Não tem = 2 1 a 3 doenças = 3 4 ou mais doenças = -	Não tem = 1 1 a 3 doenças = 4 4 ou mais doenças = -	Não tem = 1 1 a 3 doenças = 4 4 ou mais doenças = -	Não tem = 3 1 a 3 doenças = 2 4 ou mais doenças = -
4) Masculino 18 - 45	Não tem = 15 1 a 3 doenças = 3 4 ou mais doenças = -	Não tem = 3 1 a 3 doenças = 15 4 ou mais doenças = -	Não tem = 12 1 a 3 doenças = 6 4 ou mais doenças = -	Não tem = 10 1 a 3 doenças = 8 4 ou mais doenças = -
5) Masculino 46 - 60	Não tem = 22 1 a 3 doenças = 3 4 ou mais doenças = -	Não tem = 14 1 a 3 doenças = 11 4 ou mais doenças = -	Não tem = 10 1 a 3 doenças = 15 4 ou mais doenças = -	Não tem = 18 1 a 3 doenças = 7 4 ou mais doenças = -
6) Masculino 60 +	Não tem = 9 1 a 3 doenças = 3 4 ou mais doenças = -	Não tem = 7 1 a 3 doenças = 5 4 ou mais doenças = -	Não tem = 4 1 a 3 doenças = 8 4 ou mais doenças = -	Não tem = 9 1 a 3 doenças = 3 4 ou mais doenças = -

Dos 77 participantes do estudo, 57 não apresentam doenças de perfil inflamatório, enquanto 20 apresentam (sobretudo diabetes, e alguns deles, hipotireoidismo). Essas doenças aparecem em parentes de primeiro grau de 48 agricultores (incluindo seus pais, tios, irmãos, primo-irmãos ou filhos), enquanto 29 deles não têm parentes próximos com nenhuma dessas doenças (ou eles desconhecem que tenham).

Em relação às doenças neurológicas (incluindo depressão, ansiedade, epilepsia, alterações motoras, auditivas ou labirintite), 30 agricultores não apresentam nenhuma dessas doenças, enquanto 47 apresentam ao menos uma dessas condições. Essas mesmas alterações aparecem em parentes de primeiro grau de 27 agricultores, enquanto 50 deles não têm parentes próximos com nenhuma dessas doenças (ou eles desconhecem que tenham).

4.3 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

A população estudada tinha mais homens do que mulheres (71,4 % homens x 28,6 % mulheres), sem diferenças significativas em relação à idade ($p = 0,964$) e tempo de trabalho ($p = 0,774$). As variáveis idade, tempo de trabalho e IMC tiveram distribuição normal ($p > 0,05$).

A média de idade da população (homens e mulheres) foi de $49,95 \pm 13,98$ anos e mediana de 51 (19 - 78). A média do tempo de trabalho de ambos os sexos foi de $32,97 \pm 16,98$ anos e mediana de 36 (1 - 69). A média do IMC foi de $27,49 \pm 4,18$.

Em relação ao uso de EPIs, 49,4 % deles não faziam uso de EPIs. Não houve diferença significativa entre idade ($p = 0,514$) e tempo de trabalho ($p = 0,972$), comparando-se homens e mulheres.

O álcool era consumido por 77,9 % da população, enquanto 22,1 % não consumia. Sem diferença significativa entre idade ($p = 0,104$) e tempo de trabalho ($p = 0,547$). Em relação ao tabagismo, 6,5 % dos agricultores eram fumantes, 81,8 % eram não fumantes e 11,7 % eram ex-fumantes. Não houve diferença significativa em relação ao hábito de fumar e o tempo de trabalho ($p = 0,101$); porém, houve diferença significativa entre o tabagismo e a idade da população ($p = 0,014$). A média de idade dos fumantes foi de $64,33 \pm 6,5$ anos; a de não fumantes foi de $43,33 \pm 14,8$ anos e a de ex-fumantes, a média foi de $53 \pm 7,55$ anos. A idade do grupo de não fumantes foi menor, quando comparada aos ex-fumantes ($p = 0,036$).

Em relação às doenças sistêmicas de perfil inflamatório, considerando-se primeiramente as mulheres: 37,5 % das que têm 18 – 45 anos, 55,56 % daquelas entre 46 – 60 anos, e 60 % das que têm acima de 60 anos, apresentam alguma doença (sobretudo diabetes ou hipotireoidismo). Em relação ao histórico familiar, 75 % das mulheres entre 18 – 45 anos, 77,78 % das que têm 46 – 60 anos, e 80 % daquelas acima de 60 anos, têm parentes de primeiro grau com alguma doença sistêmica. Ainda considerando as mulheres, em relação às doenças neurológicas (incluindo depressão, ansiedade, ou doenças neurodegenerativas), 75 % das que têm 18 – 45 anos, 88,89 % daquelas entre 46 – 60 anos, e 80 % das que têm acima de 60 anos, apresentam alguma dessas doenças. Em relação ao histórico familiar, 50 % das mulheres entre 18 – 45 anos, 33,33 % das que têm 46 – 60 anos, e 40 % daquelas acima de 60 anos, têm parentes de primeiro grau com alguma doença neurológica.

As doenças sistêmicas de perfil inflamatório nos homens, apresentam-se da seguinte maneira: 16,67 % dos que têm 18 – 45 anos, 12 % daqueles entre 46 – 60 anos, e 25 % dos que têm acima de 60 anos, apresentam alguma dessas doenças.

Em relação ao histórico familiar, 83,33 % dos homens entre 18 – 45 anos, 44 % dos que têm 46 – 60 anos, e 41,67 % daqueles acima de 60 anos, têm parentes de primeiro grau com alguma doença sistêmica. Ainda considerando o sexo masculino, em relação às doenças neurológicas, 33,33 % dos que têm 18 – 45 anos, 60 % daqueles entre 46 – 60 anos, e 66,67 % dos que têm acima de 60 anos, apresentam alguma dessas doenças. Em relação ao histórico familiar, 44,44 % dos homens entre 18 – 45 anos, 28 % dos que têm 46 – 60 anos, e 25 % daqueles acima de 60 anos, têm parentes de primeiro grau com alguma doença neurológica.

4.3.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA – GRUPO EXTRATO

O grupo extrato era composto na grande maioria por homens (71 %). A grande maioria deles aplicava os agrotóxicos com pulverizador costal (76 %) e 45 % deles não utilizava EPIs. Entre as mulheres, 83 % delas apenas auxiliava na aplicação, e 67 % delas não utilizava EPIs.

A média de idade dos agricultores que estavam no grupo extrato (homens e mulheres; n = 41; Tabela 10), era de $51,44 \pm 13,37$ anos e mediana de 50 (22 - 78). A média do IMC foi de $26,95 \pm 3,55$ e mediana de 26,44 (18,72 - 34,72).

O mesmo percentual de não fumantes foi encontrado tanto entre os homens quanto entre as mulheres; em ambos os sexos 83 % dos homens, e 83 % das mulheres não fumavam. Esse mesmo percentual (83 %) de homens bebia, enquanto entre as mulheres, 42 % tinham o hábito de ingerir bebida alcoólica.

Em relação aos dados clínicos, 58 % das mulheres tinha alguma doença sistêmica de perfil inflamatório (obesidade; hipotireoidismo; diabetes; doenças cardiovasculares) e esse mesmo percentual de mulheres (58 %) apresentava histórico familiar de doenças neurológicas (ansiedade; depressão; zumbido no ouvido; tremores; espasmos; tonturas; alterações na audição). A extensa maioria das mulheres (92 %) tinha histórico familiar de doença sistêmica, e 75 % das mulheres tinha alguma doença neurológica.

Em relação aos homens, 76 % deles não apresentava nenhuma doença de perfil inflamatório (ou desconhecia que tivesse), e 59 % deles tinha histórico familiar de doenças sistêmicas. Em relação às doenças neurológicas, 72 % deles apresentava alguma doença neurológica, e 34 % deles tinha histórico familiar dessas doenças.

Todos os dados referentes ao grupo que foi submetido à suplementação com o extrato estão de acordo com as Tabelas 10, 11, 12, 13 e 14 (item 4.4), onde foram separados de acordo com seu sexo e sua faixa etária.

Os participantes que faziam parte do grupo placebo (0), assim como os que faziam parte do grupo extrato (1) foram conhecidos após realização de todos os experimentos (Tabela 10).

Tabela 10: Grupo Placebo (0) e Grupo Extrato (1).

EX	PLACEBO (0)	EXTRATO (1)	EX	PLACEBO (0)	EXTRATO (1)
01		X	44	X	
02		X	45	X	
03		X	46	X	
04	X		47	X	
05		X	48	X	
06	-----	-----	49		X
07		X	50	X	
08	-----	-----	51		X
09		X	52	X	
10	X		53		X
11		X	54	X	
12		X	55	X	
13	X		56		X
14		X	57		X
15		X	58	-----	-----
16	X		59	X	
17		X	60		X
18		X	61	X	
19		X	62	X	
20	X		63	-----	-----
21	X		64	-----	-----
22		X	65	X	
23	X		66		X
24	X		67	-----	-----
25		X	68		X
26	X		69	X	
27	X		70		X
28		X	71		X
29		X	72	X	
30	X		73	X	
31		X	74		X
32		X	75		X
33	X		76		X
34	X		77	-----	-----
35		X	78	-----	-----
36		X	79	X	
37		X	80		X
38		X	81		X
39		X	82	X	
40	X		83	X	
41		X	84	X	
42		X	85	X	
43	X				

Número de participantes de cada grupo: Placebo (0) = 36; Extrato (1) = 41

Sendo assim, dos 77 participantes do estudo, 36 tomaram placebo, e 41 tomaram o extrato. Esses 41 agricultores foram então divididos de acordo com o seu sexo e a sua faixa etária, conforme a Tabela 11.

Tabela 11: Agricultores que tomaram o extrato, de acordo com o sexo e a faixa etária.

GRUPO (sexo e idade)	n° de participantes	% de participantes do grupo extrato/ grupo (sexo e idade)
1) Feminino 18 - 45	4	9,70 %
2) Feminino 46 - 60	5	12,20 %
3) Feminino 60 +	3	7,30 %
4) Masculino 18 - 45	9	22,00 %
5) Masculino 46 - 60	12	29,30 %
6) Masculino 60 +	8	19,50 %

A partir desse momento, todas as análises foram realizadas comparando o antes e o depois da intervenção no grupo extrato.

Como pode-se observar na Tabela 11, a maioria dos participantes submetidos à intervenção eram homens entre 46 e 60 anos.

De acordo com o sexo e a faixa etária, a amostra foi caracterizada quanto à sua relação com os agrotóxicos (Tabela 12).

Tabela 12: Caracterização dos agricultores que tomaram o extrato, quanto a sua relação com os agrotóxicos, de acordo com o sexo e a faixa etária.

GRUPO (sexo e idade)	Tempo de exposição à agrotóxicos	Não usa EPI	Modo de aplicação	Cuidados após aplicação
1) Feminino 18 – 45 (n = 4)	5 – 9 anos: 2 16 – 20 anos: 2	3	Auxilia: 4	Toma banho: 1 Não faz nada: 3
2) Feminino 46 – 60 (n = 5)	Mais de 30 anos: 5	3	Usa máquina: 2 Auxilia: 3	Lava as mãos: 2 Toma banho: 3
3) Feminino 60 + (n = 3)	10 a 15 anos: 1 Mais de 30 anos: 2	2	Auxilia: 3	Lava as mãos: 2 Não faz nada: 1
4) Masculino 18 – 45 (n = 9)	10 – 15 anos: 3 16 – 20 anos: 4 Mais de 30 anos: 2	3	Pulverizador: 7 Máquina: 2	Toma banho: 7 Não faz nada: 2
5) Masculino 46 – 60 (n = 12)	21 – 30 anos: 1 Mais de 30 anos: 11	7	Pulverizador: 9 Máquina: 3	Lava as mãos: 6 Toma banho: 6
6) Masculino 60 + (n = 8)	Mais de 30 anos: 8	3	Pulverizador: 6 Máquina: 2	Lava as mãos: 3 Toma banho: 5

As mulheres mais jovens (de 18 a 45 anos) na grande maioria (75 %) não utilizam EPIs, assim como seguem as suas atividades normalmente após o contato com o agrotóxico. Todas elas apenas auxiliam na aplicação do agrotóxico.

A maioria das mulheres de 46 a 60 anos não utilizam EPIs, apenas auxiliam na aplicação do agrotóxico, e tomam banho após o seu uso (60 % delas em cada um desses parâmetros considerados).

Todas as mulheres mais velhas (acima de 60 anos), apenas auxiliam na aplicação do agrotóxico; a maioria delas utiliza EPIs, assim como lava as mãos após o manuseio (67 % delas em cada uma dessas variáveis).

Já em relação aos homens mais jovens (de 18 a 45 anos), apenas 33 % deles não utiliza EPIs; 77 % deles utiliza pulverizador costal e essa mesma porcentagem de agricultores toma banho após o uso.

Pouco mais da metade dos homens de 46 a 60 anos (58 %) não utiliza EPIs, e a grande maioria deles (75 %) aplica o agrotóxico com o pulverizador costal. A metade desse grupo lava as mãos após o seu manuseio.

Dentre os homens mais velhos (acima de 60 anos), 37 % deles não utiliza EPIs, e 75 % deles utiliza pulverizador costal para a aplicação; 63 % desses agricultores toma banho após o uso.

De acordo com o sexo e a faixa etária, aqueles que tomaram o extrato também foram caracterizados quanto aos seus hábitos, conforme a Tabela 13.

Tabela 13: Caracterização dos agricultores que tomaram o extrato, quanto aos seus hábitos, de acordo com o sexo e a faixa etária.

GRUPO (sexo e idade)	Fuma	Bebe álcool
1) Feminino 18 – 45 (n = 4)	Não: 3 Ex fumante: 1	Sim: 2 Não: 2
2) Feminino 46 – 60 (n = 5)	Não: 5	Sim: 2 Não: 3
3) Feminino 60 + (n = 3)	Não: 2 Ex fumante: 1	Sim: 1 Não: 2
4) Masculino 18 – 45 (n = 9)	Não: 9	Sim: 8 Não: 1
5) Masculino 46 – 60 (n = 12)	Não: 11 Ex fumante: 1	Sim: 11 Não: 1
6) Masculino 60 + (n = 8)	Sim: 2 Não: 4 Ex fumante: 2	Sim: 5 Não: 3

A metade das mulheres mais jovens (de 18 a 45 anos) bebe álcool, mas 75 % delas não fuma. Nenhuma das mulheres de 46 a 60 anos fuma, e 40 % delas bebe álcool. No grupo de mulheres mais velhas (acima de 60 anos), 67 % delas não fuma e nem ingere bebida alcoólica.

Nenhum dos homens mais jovens (de 18 a 45 anos) fuma, mas 89 % deles bebe álcool. No grupo de homens de 46 a 60 anos, 92 % deles não fuma mas a mesma porcentagem ingere bebida alcoólica. A metade dos homens mais velhos (acima de 60 anos) não fuma, mas 63 % deles bebe álcool.

De acordo com o sexo e a faixa etária, a amostra que tomou o extrato também foi caracterizada quanto aos seu histórico clínico, conforme a Tabela 14.

Tabela 14: Histórico clínico (pessoal e de familiares) – doenças sistêmicas de perfil inflamatório e doenças neurológicas dos agricultores que tomaram o extrato, de acordo com o sexo e a faixa etária.

GRUPO (sexo e idade)	Doença sistêmica de perfil inflamatório	Doença sistêmica de perfil inflamatório Em parente de 1° grau	Depressão; ansiedade Doença neurológica	Depressão; ansiedade Doença neurológica Em parente de 1° grau
1) Feminino 18 – 45 (n = 4)	Não tem = 2 1 a 3 doenças = 2	1 a 3 doenças = 4	Não tem = 1 1 a 3 doenças = 3	Não tem = 2 1 a 3 doenças = 2
2) Feminino 46 – 60 (n = 5)	Não tem = 2 1 a 3 doenças = 3	Não tem = 1 1 a 3 doenças = 4	Não tem = 1 1 a 3 doenças = 4	Não tem = 2 1 a 3 doenças = 3
3) Feminino 60 + (n = 3)	Não tem = 1 1 a 3 doenças = 2	1 a 3 doenças = 3	Não tem = 1 1 a 3 doenças = 2	Não tem = 1 1 a 3 doenças = 2
4) Masculino 18 – 45 (n = 9)	Não tem = 7 1 a 3 doenças = 2	Não tem = 1 1 a 3 doenças = 8	Não tem = 1 1 a 3 doenças = 8	Não tem = 5 1 a 3 doenças = 4
5) Masculino 46 – 60 (n = 12)	Não tem = 10 1 a 3 doenças = 2	Não tem = 7 1 a 3 doenças = 5	Não tem = 5 1 a 3 doenças = 7	Não tem = 8 1 a 3 doenças = 4
6) Masculino 60 + (n = 8)	Não tem = 5 1 a 3 doenças = 3	Não tem = 4 1 a 3 doenças = 4	Não tem = 2 1 a 3 doenças = 6	Não tem = 6 1 a 3 doenças = 2

A metade das mulheres mais jovens (de 18 a 45 anos) tem doenças de perfil inflamatório (sobretudo obesidade, hipotireoidismo, diabetes, doenças cardiovasculares), e todas têm histórico familiar dessas doenças. 75 % delas têm alterações neurológicas (como zumbido no ouvido, tontura, alterações na audição, tremores, espasmos, ansiedade ou depressão), e metade delas tem histórico dessas doenças.

Entre as mulheres de 46 a 60 anos, 60 % delas tem doenças de perfil inflamatório e 80 % delas têm histórico familiar dessas doenças. 80 % delas têm alterações neurológicas e 60 % dessas mulheres tem histórico dessas doenças.

66,7 % das mulheres mais velhas (acima de 60 anos) tem doenças de perfil inflamatório e todas têm histórico familiar dessas doenças. 66,7 % delas têm alterações neurológicas, assim como esse mesmo percentual de mulheres tem histórico dessas doenças.

Já em relação aos homens mais jovens (de 18 a 45 anos), 78 % deles tem doenças de perfil inflamatório e a metade deles têm histórico familiar dessas doenças. 89 % deles têm alterações neurológicas, e 44 % deles tem histórico dessas doenças.

Entre os homens de 46 a 60 anos, 83 % deles tem doenças de perfil inflamatório e 42 % deles têm histórico familiar dessas doenças. 58 % deles têm alterações neurológicas, e 67 % deles tem histórico dessas doenças.

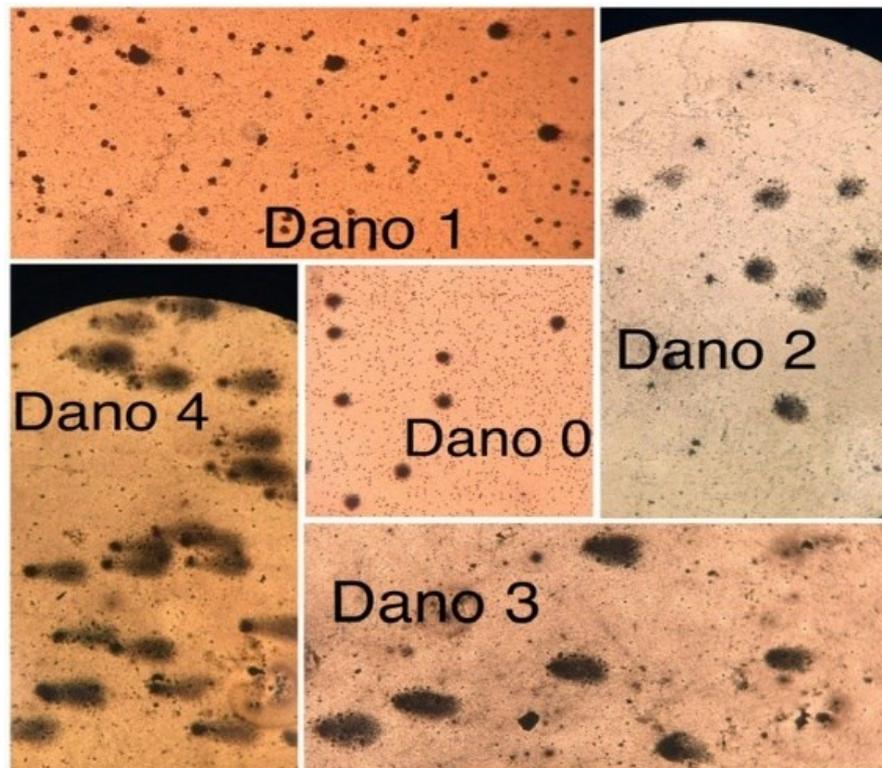
Dentre os homens mais velhos (acima de 60 anos), 38 % deles tem doenças de perfil inflamatório e 42 % deles têm histórico familiar dessas doenças. 75 % deles têm alterações neurológicas, e 25 % deles tem histórico dessas doenças.

4.4 RESULTADOS DAS ANÁLISES LABORATORIAIS

4.4.1 DANO DE DNA: ENSAIO COMETA

Tanto antes quanto depois da administração do extrato ou placebo, foi possível observar danos ao DNA variando entre 0 e 4 no ensaio cometa, conforme a Figura 7.

Figura 7 – Células submetidas ao ensaio Cometa.

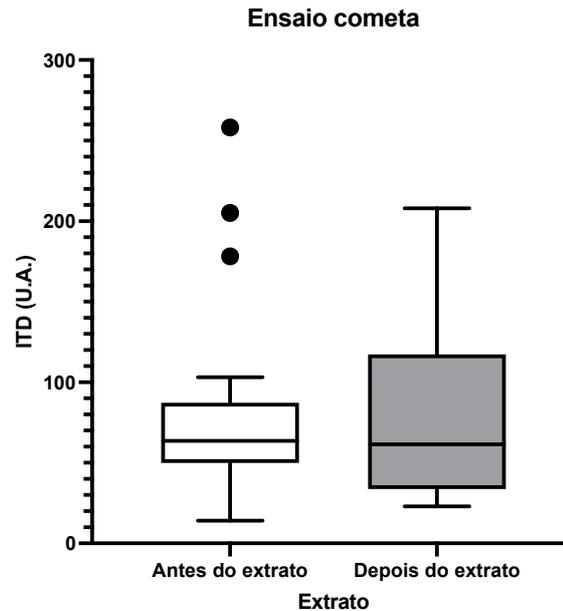


Fonte: elaborado pela autora.

A Figura 7 apresenta as classes de dano de DNA, após a corrida eletroforética e coloração com prata do ensaio cometa, observadas em diferentes agricultores, antes e após a administração do extrato ou placebo. Dano 0 = células sem danos; dano 1 = células com dano mínimo; dano 2 = células com dano médio; dano 3 = células com dano intenso; e dano 4 = células com dano máximo.

No grupo extrato, o índice de dano total no ensaio cometa não apresentou diferença significativa entre antes e depois da suplementação ($p = 0,4423$; pares; sem *outliers*), conforme a Figura 8. Valores depois do extrato: média $79,14 \pm 51,10$; mediana 61,50 (23 – 208).

Figura 8 – Ensaio Cometa. Frequência de dano total em 100 células/ indivíduo

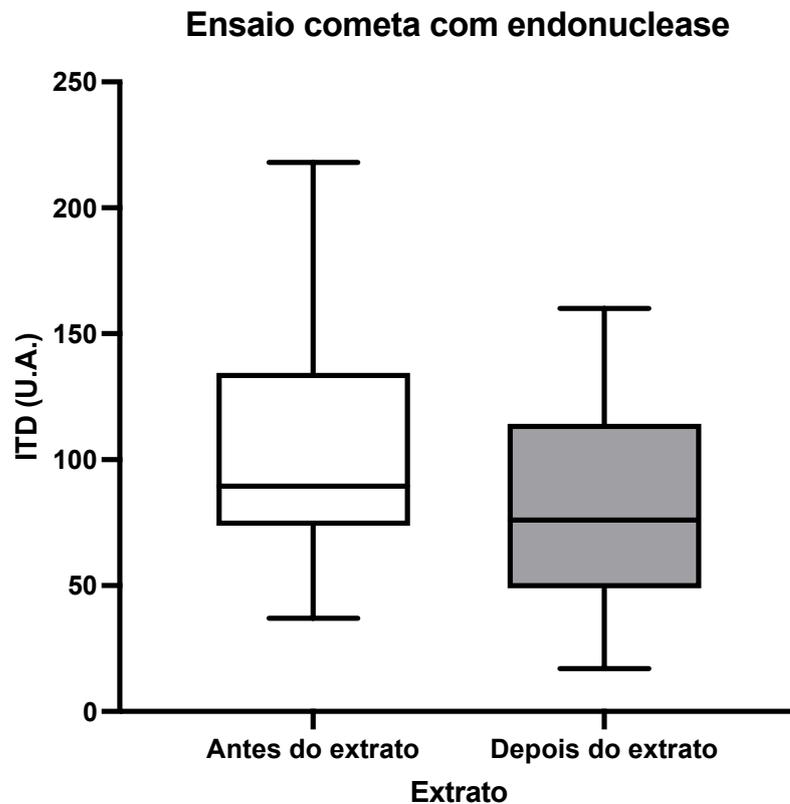


Fonte: elaborado pela autora.

Os valores de ITD estão expressos em unidades arbitrárias. As linhas horizontais internas em cada grupo representam as medianas; *boxes* e *whiskers* representam os interquartis e valores mínimos e máximos, respectivamente. ITD: Índice de Dano Total. Teste estatístico não paramétrico: Teste de Wilcoxon. Foram excluídos 4 *outliers* depois do extrato; sem *outliers* antes do extrato; $n = 22$ pares.

Não houve diferença significativa entre antes e depois no grupo extrato quanto ao índice de dano total do ensaio cometa com endonuclease ($p = 0,2064$; pares; sem *outliers*), conforme a Figura 9. Valores depois do extrato: média $82 \pm 41,14$; mediana 76 (17 – 160).

Figura 9 – Ensaio Cometa. Endonuclease total em 100 células/ indivíduo.

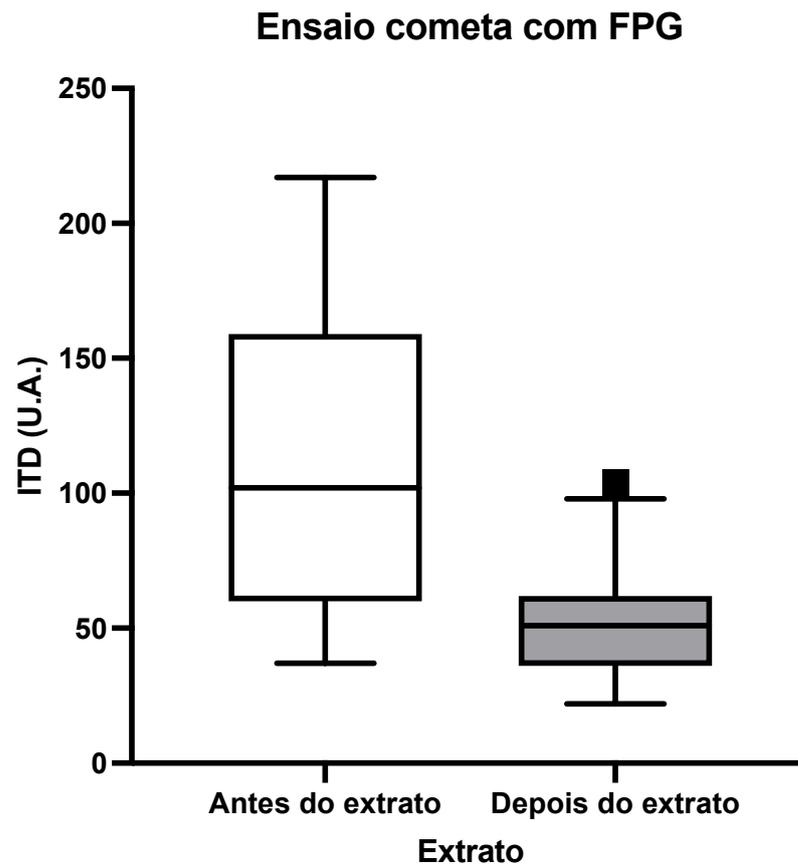


Fonte: elaborado pela autora.

Os valores de ITD estão expressos em unidades arbitrárias. As linhas horizontais internas em cada grupo representam as medianas; *boxes* e *whiskers* representam os interquartis e valores mínimos e máximos, respectivamente. ITD: Índice de Dano Total. Teste estatístico paramétrico: Teste *t* pareado. Não foram excluídos *outliers* (sem *outliers*) em ambos os grupos (antes e depois do extrato); n = 18 pares.

No grupo extrato, houve diferença estatisticamente significativa após o uso do extrato ($p = 0,0125$; pares; sem *outliers*), com diminuição do índice de dano total com FPG, conforme a Figura 10. Valores depois do extrato: média $54,40 \pm 29,91$; mediana 51 (22 – 104).

Figura 10 – Ensaio Cometa. FPG total em 100 células/ indivíduo.

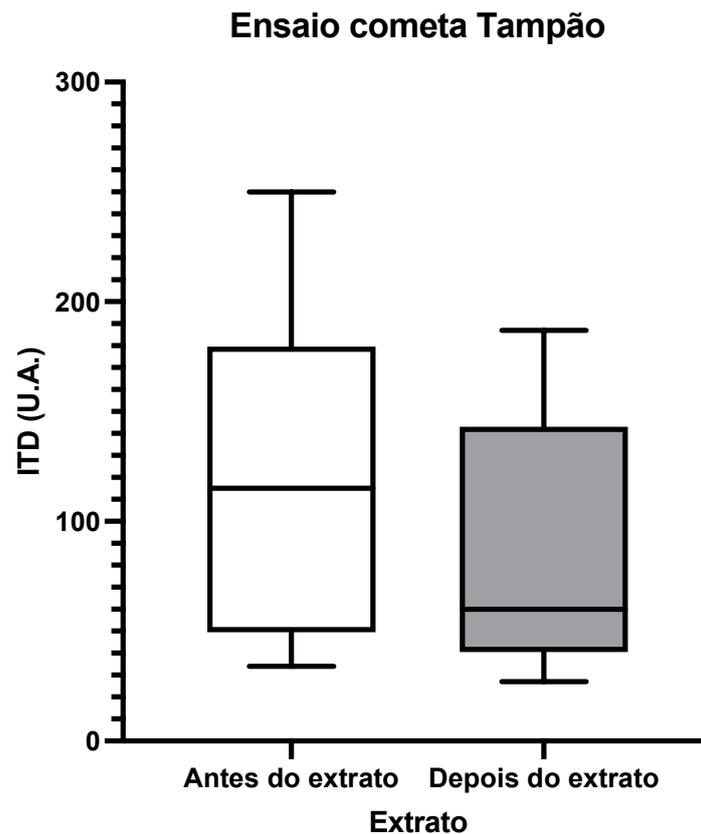


Fonte: elaborado pela autora.

Os valores de ITD estão expressos em unidades arbitrárias. As linhas horizontais internas em cada grupo representam as medianas; *boxes* e *whiskers* representam os interquartis e valores mínimos e máximos, respectivamente. ITD: Índice de Dano Total. Teste estatístico não paramétrico: Teste de Wilcoxon. Não foram excluídos 4 *outliers* depois do extrato; sem *outliers* antes do extrato; n = 15 pares.

O grupo extrato não apresentou diferença significativa entre antes e depois da intervenção, quanto ao índice de dano total do ensaio cometa com tampão ($p = 0,1439$; pares; sem *outliers*), conforme a Figura 11. Valores depois do extrato: média $82,76 \pm 53,53$; mediana 60 (27 – 187).

Figura 11 – Ensaio Cometa. Tampão total em 100 células/ indivíduo.



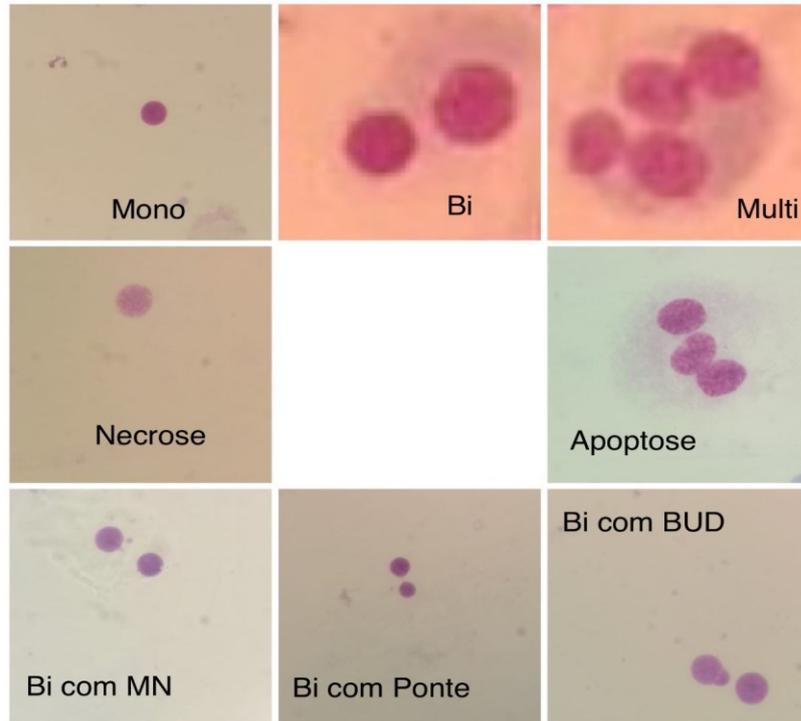
Fonte: elaborado pela autora.

Os valores de ITD estão expressos em unidades arbitrárias. As linhas horizontais internas em cada grupo representam as medianas; *boxes* e *whiskers* representam os interquartis e valores mínimos e máximos, respectivamente. ITD: Índice de Dano Total. Teste estatístico não paramétrico: Teste de Wilcoxon. Não foram excluídos 3 *outliers* depois do extrato; sem *outliers* antes do extrato; n = 17 pares.

4.4.2 DANO DE DNA: ENSAIO MICRONÚCLEO COM BLOQUEIO DE CITOCINESE CELULAR

Tanto antes quanto depois da administração do extrato ou placebo, foi possível observar instabilidade genômica, identificada após o ensaio de micronúcleos com bloqueio de citocinese celular. Índice mitótico: célula mononucleada; binucleada; multinucleada. Viabilidade celular: célula necrótica; célula apoptótica. Alterações nucleares: célula binucleada contendo micronúcleo (MN); célula BN contendo ponte; célula BN contendo *bud*, conforme a Figura 12.

Figura 12 - Alterações encontradas pela Técnica de micronúcleos (CBMN).

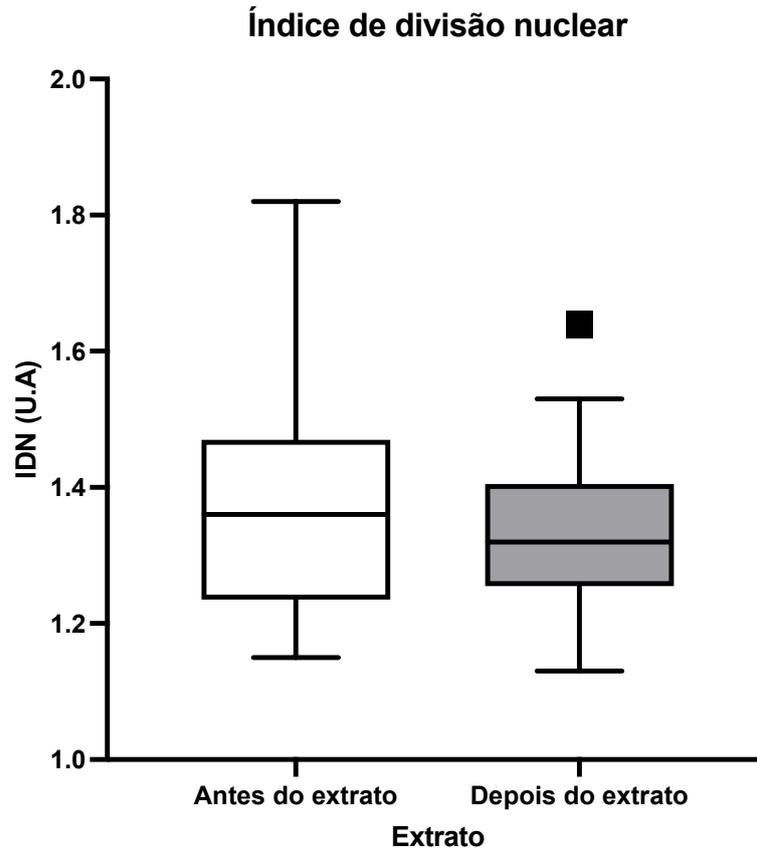


Fonte: elaborado pela autora.

A Figura 12 apresenta a instabilidade genômica identificada após o ensaio de micronúcleos com bloqueio de citocinese celular, em diferentes agricultores, antes e após a administração do extrato ou placebo. Células coradas com Giemsa. Índice mitótico: célula mononucleada; célula binucleada (BN); célula multinucleada. Viabilidade celular: célula necrótica; célula apoptótica. Alterações nucleares: célula binucleada contendo micronúcleo (MN); célula BN contendo ponte; célula BN contendo *bud*.

No grupo extrato, o índice mitótico (índice de divisão nuclear) no ensaio de micronúcleo com bloqueio de citocinese celular, não apresentou diferença significativa entre antes e após a intervenção ($p = 0,4023$; pares; sem *outliers*), conforme a Figura 13. Valores depois do extrato: média $1,34 \pm 0,12$; mediana 1,32 (1,13 – 1,64).

Figura 13 – Ensaio Micronúcleo com Bloqueio de Citocinese celular. Frequência de dano total em 500 células / indivíduo. Índice Mitótico.

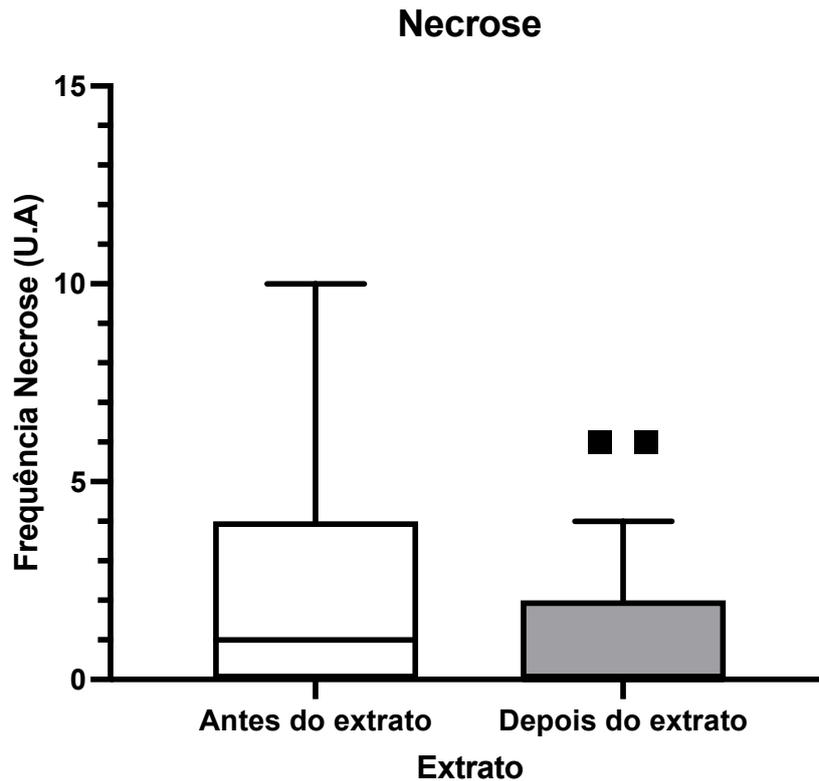


Fonte: elaborado pela autora.

Os valores de IDN estão expressos em unidades arbitrárias. As linhas horizontais internas em cada grupo representam as medianas; *boxes* e *whiskers* representam os interquartis e valores mínimos e máximos, respectivamente. IDN: Índice de Divisão Nuclear. Teste estatístico não paramétrico: Teste de Wilcoxon. Não foram excluídos *outliers* (sem *outliers*) em ambos os grupos (antes e depois do extrato); n = 33 pares.

No grupo extrato, a necrose no ensaio de micronúcleo com bloqueio de citocinese celular, não apresentou diferença significativa ($p = 0,2360$; pares; sem *outliers*), conforme a Figura 14. Valores depois do extrato: média $1,28 \pm 1,99$; mediana 0 (0 – 6).

Figura 14 – Ensaio Micronúcleo com Bloqueio de Citocinese celular. Frequência de dano total em 500 células / indivíduo. Necrose.

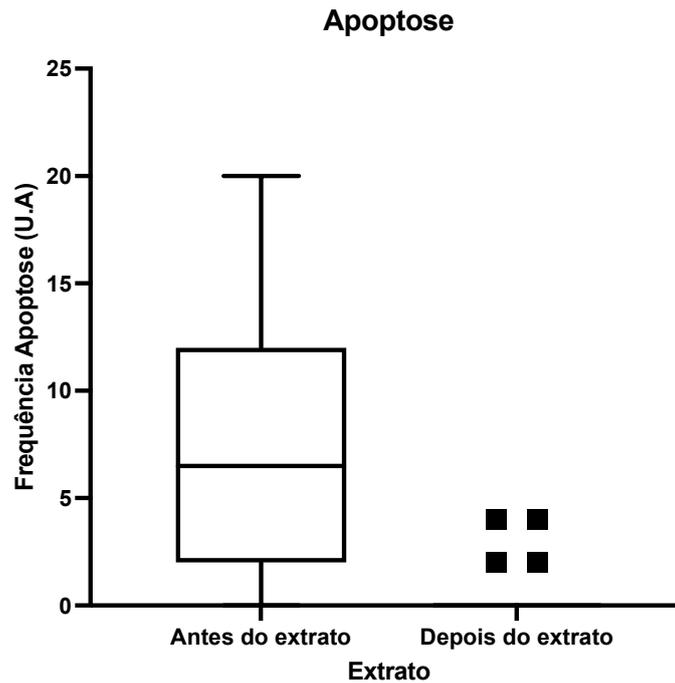


Fonte: elaborado pela autora.

Os valores de Frequência de Necrose estão expressos em unidades arbitrárias. As linhas horizontais internas em cada grupo representam as medianas; *boxes* e *whiskers* representam os interquartis e valores mínimos e máximos, respectivamente. Teste estatístico não paramétrico: Teste de Wilcoxon. Foram excluídos 5 *outliers* antes do extrato e 3 *outliers* depois do extrato; n = 25 pares.

A apoptose no ensaio de micronúcleo com bloqueio de citocinese celular, apresentou diferença estatisticamente significativa entre antes e após a suplementação, com diminuição da sua frequência ($p < 0,001$; pares; sem *outliers*), conforme a Figura 15. Valores após extrato: média $0,5 \pm 1,21$; mediana 0 (0 – 4).

Figura 15 – Ensaio Micronúcleo com Bloqueio de Citocinese celular. Frequência de dano total em 500 células / indivíduo. Apoptose.

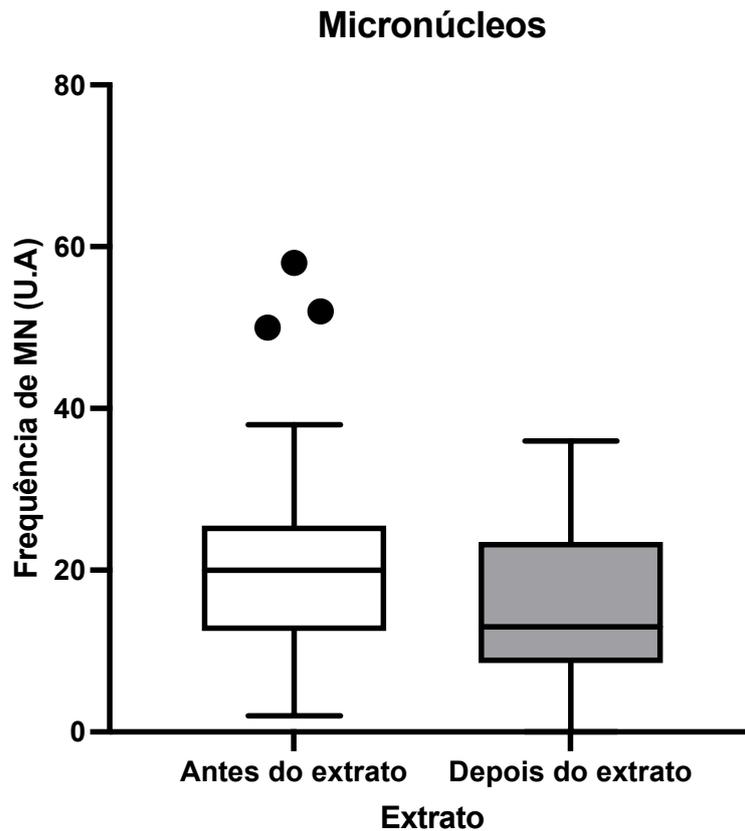


Fonte: elaborado pela autora.

Os valores de Frequência de Apoptose estão expressos em unidades arbitrárias. As linhas horizontais internas em cada grupo representam as medianas; *boxes* e *whiskers* representam os interquartis e valores mínimos e máximos, respectivamente. Teste estatístico não paramétrico: Teste de Wilcoxon. Foram excluídos 9 *outliers* depois do extrato; sem exclusão de *outliers* antes do extrato; n = 24 pares.

A frequência de micronúcleos no CBMN, apresentou diferença estatisticamente significativa entre antes e após o extrato, com diminuição de sua frequência ($p = 0,0057$; pares; sem *outliers*), conforme a Figura 16. Valores depois do extrato: média $14,69 \pm 9,75$; mediana 13 (0 – 36).

Figura 16 – Ensaio Micronúcleo com Bloqueio de Citocinese celular. Frequência de dano total em 1000 células / indivíduo. Micronúcleos.

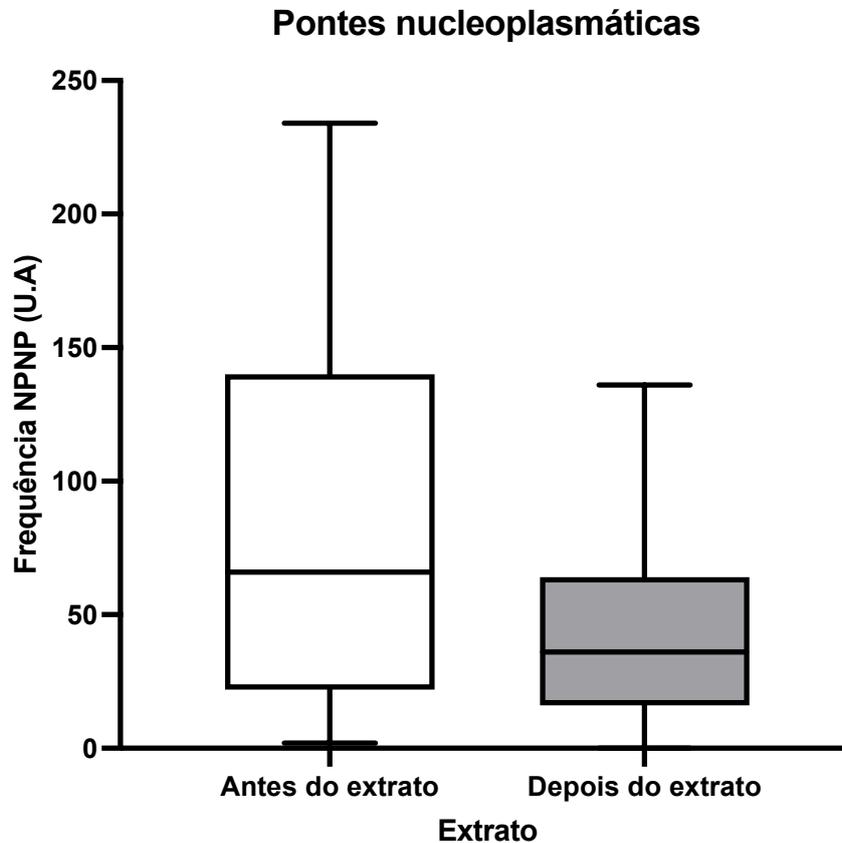


Fonte: elaborado pela autora.

Os valores de Frequência de Micronúcleos estão expressos em unidades arbitrárias. As linhas horizontais internas em cada grupo representam as medianas; *boxes* e *whiskers* representam os interquartis e valores mínimos e máximos, respectivamente. Teste estatístico não paramétrico: Teste de Wilcoxon. Foram excluídos 1 *outliers* antes do extrato; sem exclusão de *outliers* depois do extrato; n = 32 pares.

No grupo extrato, a frequência de pontes no CBMN, apresentou diferença estatisticamente significativa entre antes e depois da intervenção, com diminuição de sua frequência ($p = 0,0082$; pares; sem *outliers*), conforme a Figura 17. Valores depois do extrato: média $45,48 \pm 35,42$; mediana 36 (0 – 136).

Figura 17 – Ensaio Micronúcleo com Bloqueio de Citocinese celular. Frequência de dano total em 1000 células / indivíduo. Pontes nucleoplasmáticas.

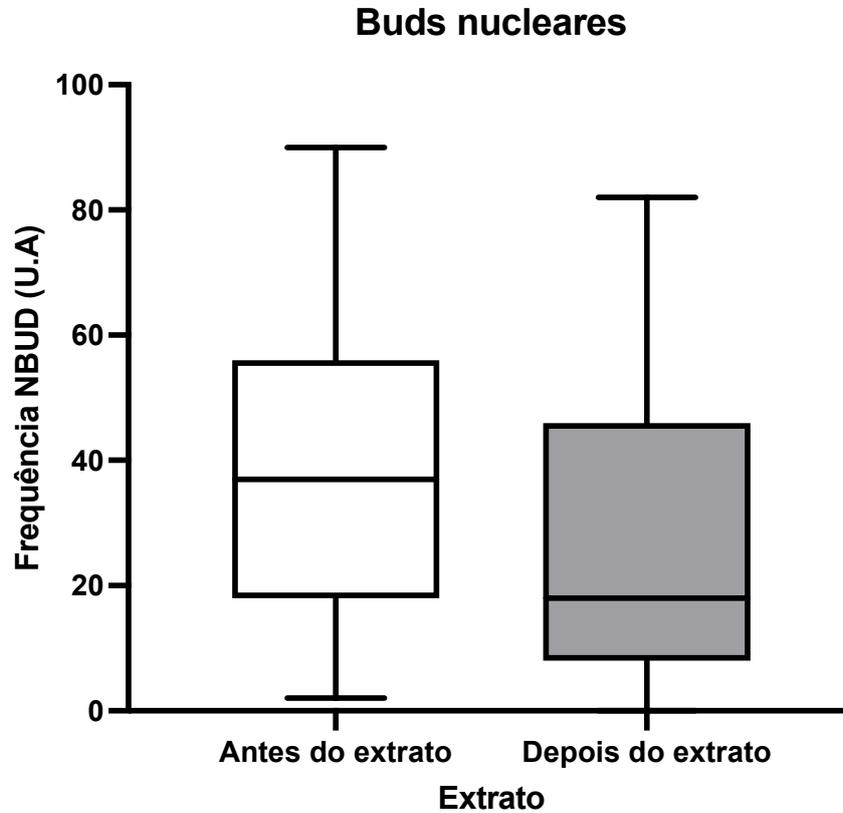


Fonte: elaborado pela autora.

Os valores de Frequência de Pontes Nucleoplasmáticas estão expressos em unidades arbitrárias. As linhas horizontais internas em cada grupo representam as medianas; *boxes* e *whiskers* representam os interquartis e valores mínimos e máximos, respectivamente. Teste estatístico não paramétrico: Teste de Wilcoxon. Não foram excluídos *outliers* antes do extrato; foram excluídos 2 *outliers* depois do extrato; n = 31 pares.

No grupo extrato, a frequência de *buds* no CBMN, (por pouco) não apresentou diferença estatisticamente significativa entre antes e depois da suplementação ($p = 0,0658$; pares; sem *outliers*), conforme a Figura 18. Valores depois do extrato: média $27,94 \pm 24,77$; mediana 18 (0 – 82).

Figura 18 – Ensaio Micronúcleo com Bloqueio de Citocinese celular. Frequência de dano total em 1000 células / indivíduo. *Buds* nucleares.



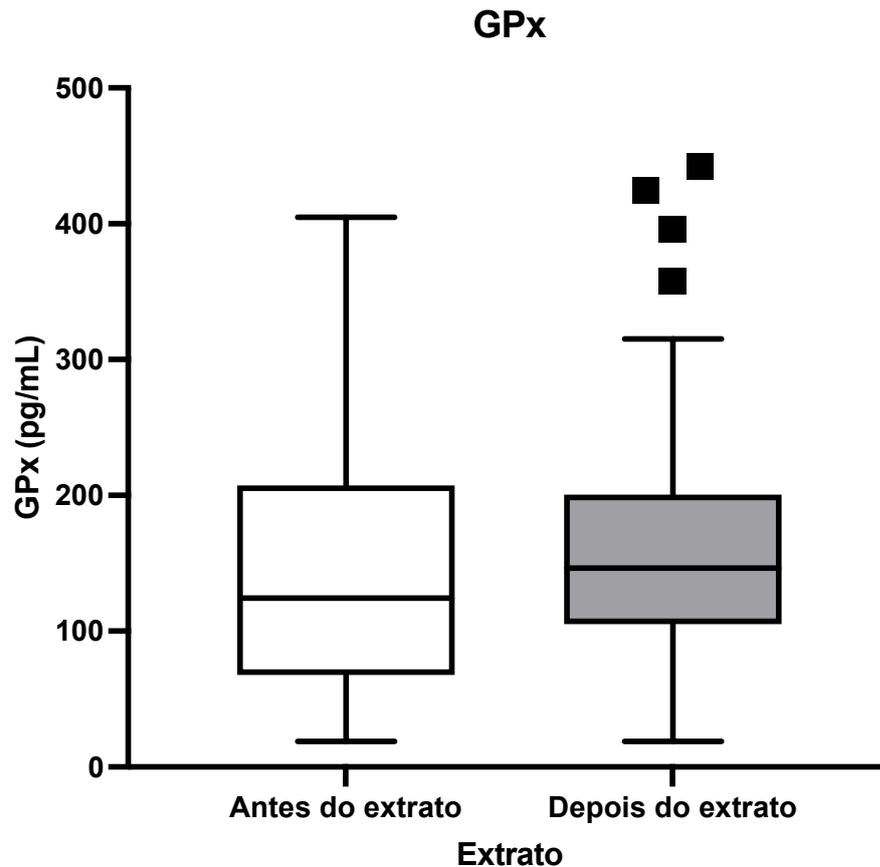
Fonte: elaborado pela autora.

Os valores de Frequência de *Buds* Nucleares estão expressos em unidades arbitrárias. As linhas horizontais internas em cada grupo representam as medianas; *boxes* e *whiskers* representam os interquartis e valores mínimos e máximos, respectivamente. Teste estatístico não paramétrico: Teste de Wilcoxon. Não foram excluídos *outliers* nem antes e nem depois do extrato; n = 33 pares.

4.4.3 ESTRESSE OXIDATIVO

No grupo extrato, a enzima antioxidante GPx, não apresentou diferença estatisticamente significativa após a intervenção ($p = 0,0844$; pares; sem *outliers*), conforme a Figura 19. Valores depois do extrato: média $169,9 \pm 104,1$; mediana 146,3 (18,75 – 442).

Figura 19 – Estresse oxidativo. GPx.



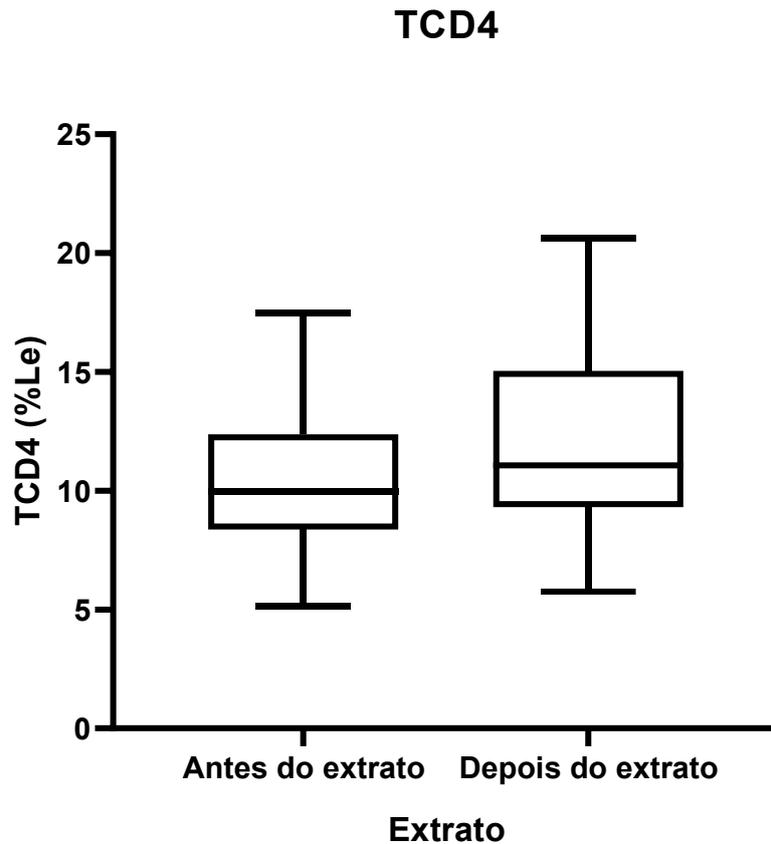
Fonte: elaborado pela autora.

Os valores de GPx estão expressos em pg / ml. As linhas horizontais internas em cada grupo representam as medianas; *boxes* e *whiskers* representam os interquartis e valores mínimos e máximos, respectivamente. Teste estatístico não paramétrico: Teste de Wilcoxon. Não foram excluídos *outliers* nem antes e nem depois do extrato; n = 36 pares.

4.4.4 ALTERAÇÕES IMUNOLÓGICAS E IMUNOFENOTIPAGEM

No grupo extrato, as células T CD4, apresentaram diferença estatisticamente significativa entre antes e após a intervenção, com aumento de sua expressão ($p = 0,0045$; pares; sem *outliers*), conforme a Figura 20. Valores depois do extrato: média $12,15 \pm 3,94$; mediana 11,06 (5,76 – 20,64).

Figura 20 – Alterações imunológicas. Células T CD4.

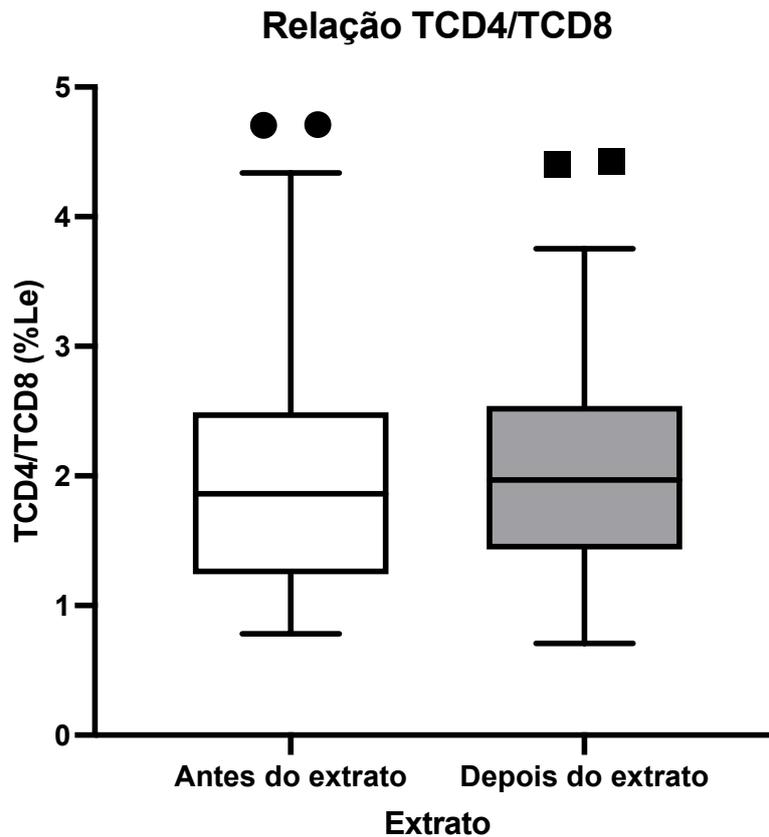


Fonte: elaborado pela autora.

Os valores de TCD4 estão expressos em % de leucócitos. As linhas horizontais internas em cada grupo representam as medianas; *boxes* e *whiskers* representam os interquartis e valores mínimos e máximos, respectivamente. Teste estatístico paramétrico: Teste *t* pareado. Não foram excluídos *outliers* nem antes e nem depois do extrato; n = 36 pares.

Houve diferença estatisticamente significativa antes e após o extrato com aumento de T CD4 /T CD8 após o extrato ($p = 0,0045$; pares; sem *outliers*), conforme a Figura 21. Valores depois do extrato: média $2,10 \pm 0,91$; mediana 1,97 (0,71 – 4,24).

Figura 21 – Alterações imunológicas. Relação Células T CD4 /T CD8.

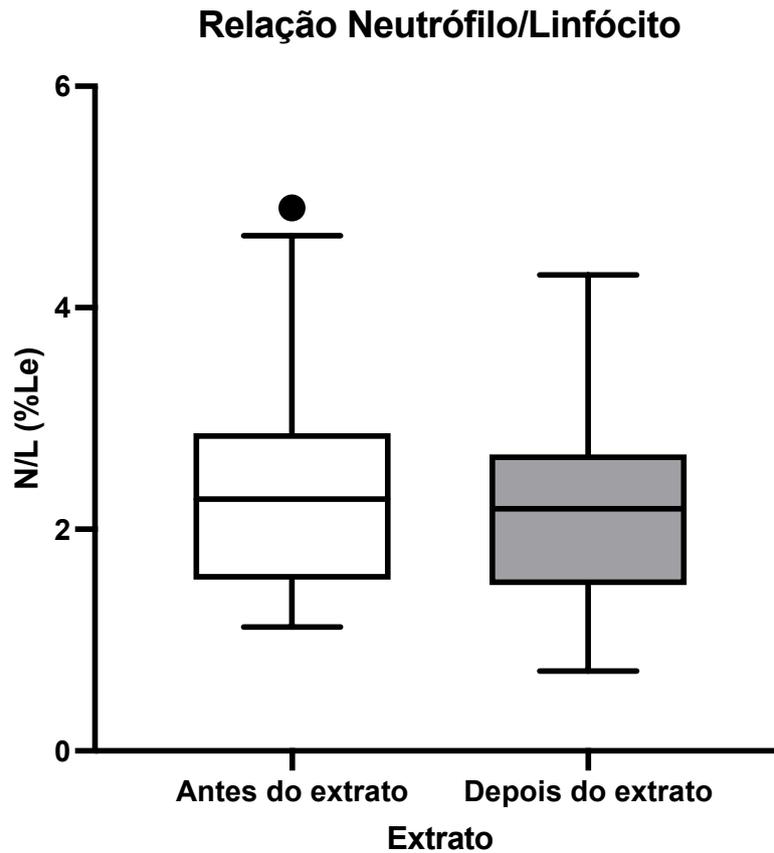


Fonte: elaborado pela autora.

Os valores da relação de TCD4/ TCD8 estão expressos em % de leucócitos. As linhas horizontais internas em cada grupo representam as medianas; *boxes* e *whiskers* representam os interquartis e valores mínimos e máximos, respectivamente. Teste estatístico não paramétrico: Teste de Wilcoxon. Não foram excluídos *outliers* nem antes e nem depois do extrato; n = 36 pares.

No grupo extrato, a relação entre neutrófilos /linfócitos, não apresentou diferença estatisticamente significativa entre antes e depois da suplementação ($p = 0,2163$; pares; sem *outliers*), conforme a Figura 22. Valores depois do extrato: média $2,12 \pm 0,81$; mediana 2,19 (0,71 – 4,29).

Figura 22 – Alterações imunológicas. Relação neutrófilos /linfócitos.



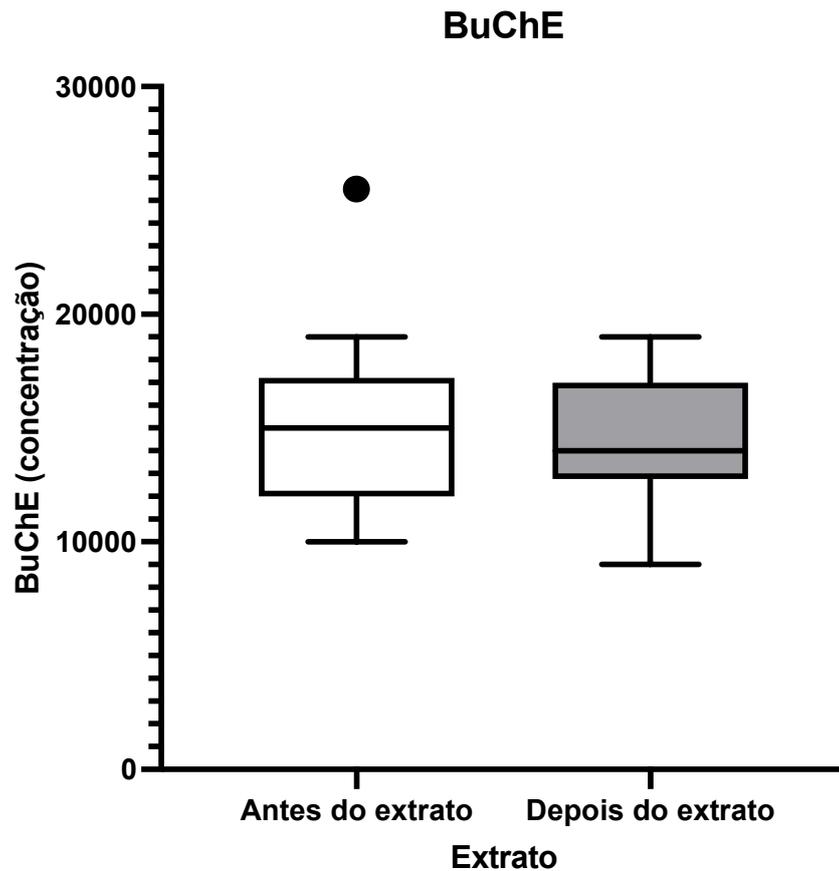
Fonte: elaborado pela autora.

Os valores da relação de neutrófilos/ leucócitos estão expressos em % de leucócitos. As linhas horizontais internas em cada grupo representam as medianas; *boxes* e *whiskers* representam os interquartis e valores mínimos e máximos, respectivamente. Teste estatístico não paramétrico: Teste de Wilcoxon. Não foram excluídos *outliers* nem antes e nem depois do extrato; n = 36 pares.

4.4.5 ALTERAÇÕES TOXICOLÓGICAS

Para a BuChE houve diferença estatisticamente significativa entre antes e após o extrato, com diminuição de BuChE após a intervenção ($p = 0,0183$; pares; sem *outliers*), conforme a Figura 23. Valores depois do extrato: média 14441 ± 2584 ; mediana 14000 (9000 – 19000).

Figura 23 – Alterações toxicológicas. Butirilcolinesterase.

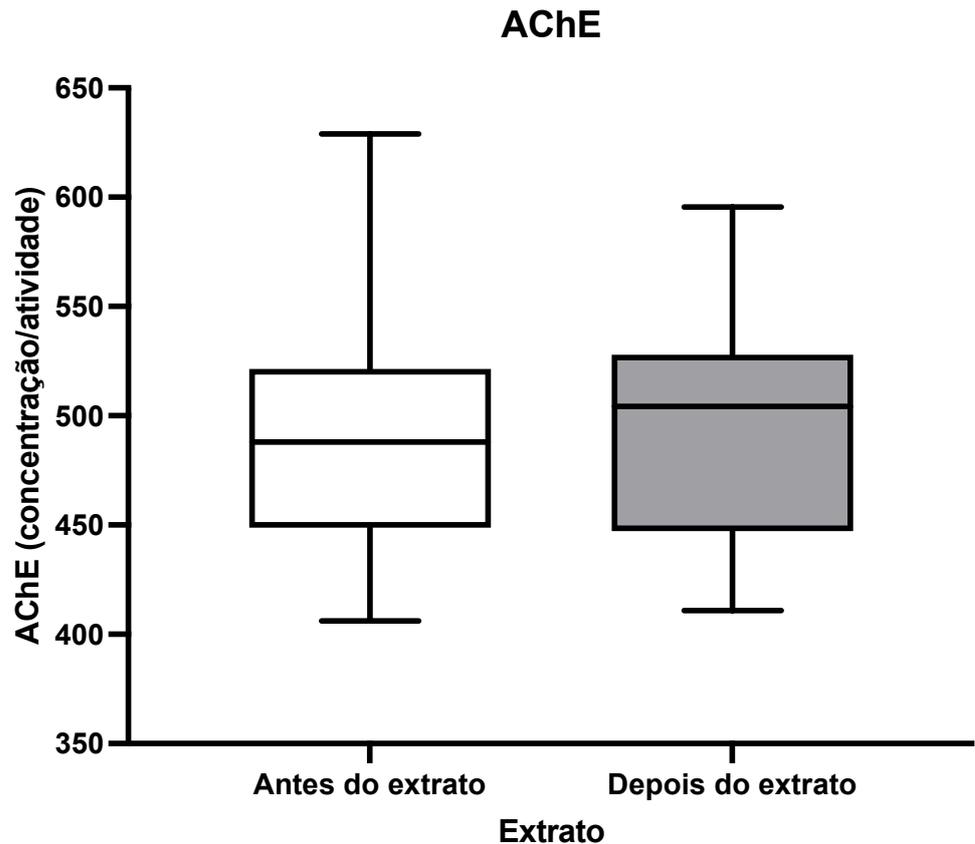


Fonte: elaborado pela autora.

Os valores da relação de BuChE estão expressos mmol/ L. As linhas horizontais internas em cada grupo representam as medianas; *boxes* e *whiskers* representam os interquartis e valores mínimos e máximos, respectivamente. Teste estatístico não paramétrico: Teste de Wilcoxon. Não foram excluídos *outliers* nem antes e nem depois do extrato; n = 32 pares.

No grupo extrato, a AChE, não apresentou diferença estatisticamente significativa ($p = 0,7461$; pares; sem *outliers*), conforme a Figura 24. Valores depois do extrato: média $492,7 \pm 49,63$; mediana 504,3 (410,9 – 595,5).

Figura 24 – Alterações toxicológicas. Acetilcolinesterase.



Fonte: elaborado pela autora.

Os valores da relação de AChE estão expressos mmol/ L. As linhas horizontais internas em cada grupo representam as medianas; *boxes* e *whiskers* representam os interquartis e valores mínimos e máximos, respectivamente. Teste estatístico não paramétrico: Teste de Wilcoxon. Não foram excluídos *outliers* nem antes e nem depois do extrato; n = 32 pares.

4.4.6 CORRELAÇÕES: GRUPO EXTRATO → ANTES DO EXTRATO

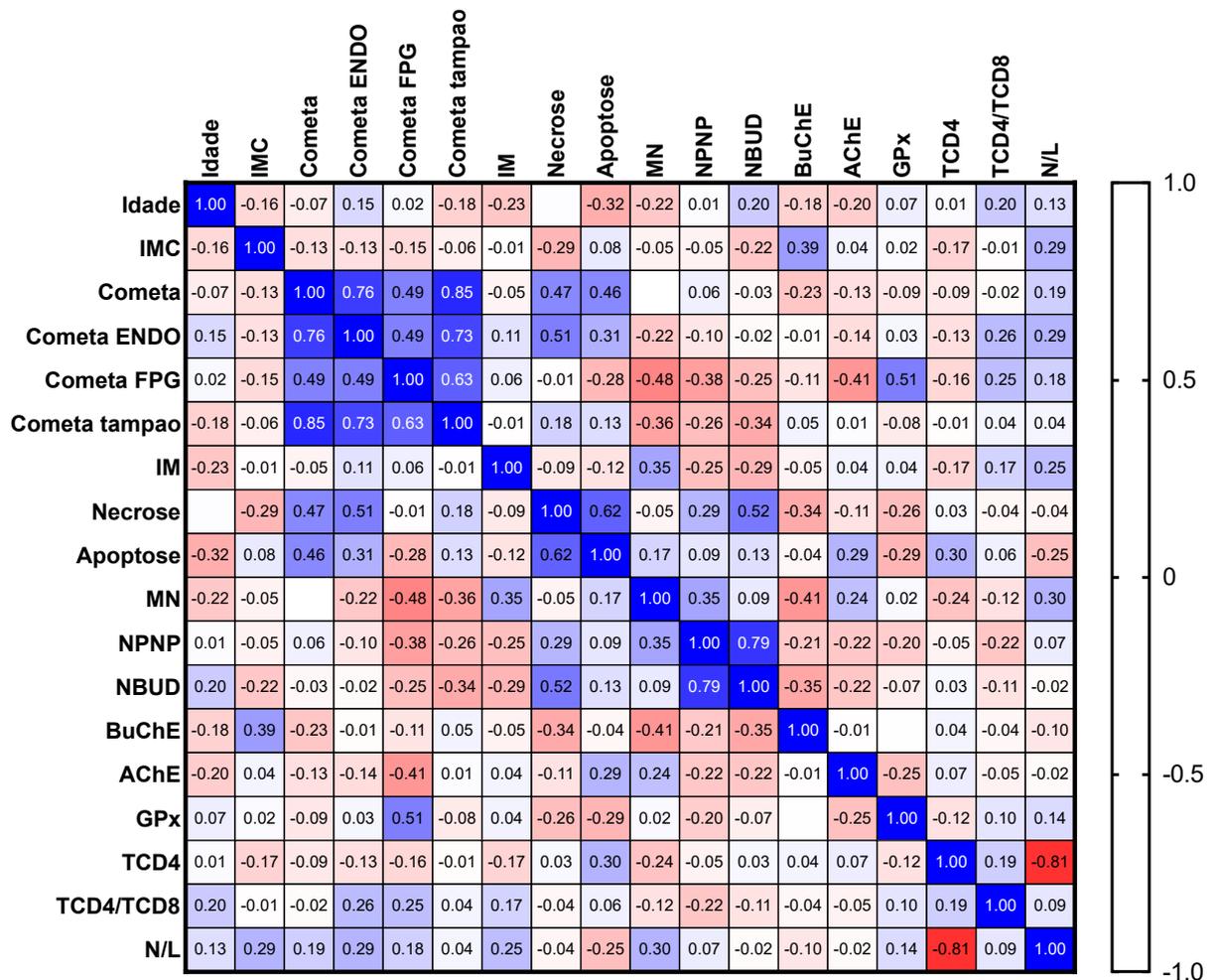
Essas correlações estão de acordo com a Figura 25.

As correlações positivas encontradas foram entre: idade e GPx - correlação positiva regular ($p= 0,048$; $r= 0,31$); IMC e BuChE - correlação positiva regular ($p= 0,028$; $r= 0,38$); CM e CM endo - correlação positiva moderada ($p< 0,001$; $r= 0,70$); CM endo e CM FPG - correlação positiva moderada ($p= 0,008$; $r= 0,69$); CM endo e CM tampão - correlação positiva moderada ($p= 0,018$; $r= 0,54$); CM endo e PNP - correlação positiva moderada ($p= 0,001$; $r= 0,60$); Necrose e apoptose - correlação positiva regular ($p= 0,004$; $r= 0,48$); Apoptose e PNP - correlação positiva fraca ($p= 0,006$; $r= 0,27$); Apoptose e BuChE - correlação positiva regular ($p= 0,003$; $r= 0,34$); MN e T CD4 - correlação positiva regular ($p= 0,020$; $r= 0,38$); GPx e N/L - correlação positiva regular ($p= 0,020$; $r= 0,37$).

Já as correlações negativas ocorreram entre: IMC e MN - correlação negativa regular ($p= 0,034$; $r= -0,35$); CM e MN - correlação negativa moderada ($p= 0,005$; $r= -0,51$); IDN e Apoptose - correlação negativa regular ($p= 0,015$; $r= -0,39$); IDN e PNP - correlação negativa regular ($p= 0,007$; $r= -0,43$); IDN e *Bud* – correlação negativa regular ($p= 0,047$; $r= -0,32$); BuChE e T CD4/T CD8 - correlação negativa regular ($p= 0,035$; $r= -0,37$).

As demais correlações não foram estatisticamente significativas.

Figura 25 – Coeficientes de correlação das variáveis analisadas no grupo extrato, antes da intervenção.



Fonte: elaborado pela autora.

As cores representam as forças de correlação. Quanto mais forte a cor, mais forte a correlação. Em azul estão as correlações positivas; em vermelho estão as correlações negativas – independe do resultado ser ou não significativo. Forças de correlação: valores de ρ ; Valores significativos: valores de p .

4.4.7 CORRELAÇÕES: GRUPO EXTRATO → DEPOIS DO EXTRATO

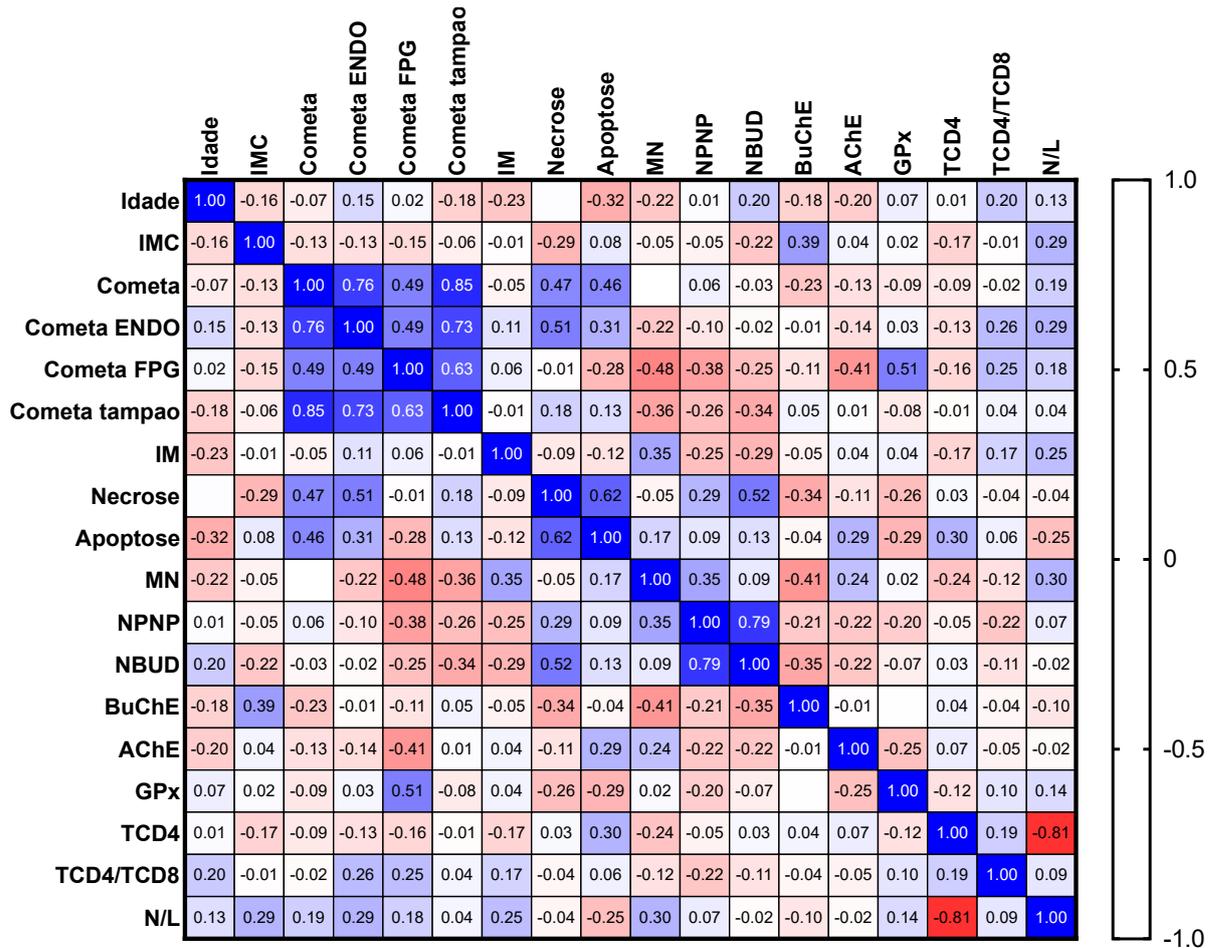
Essas correlações estão de acordo com a Figura 26.

As correlações positivas encontradas foram entre: IMC e BuChE - correlação positiva regular ($p= 0,012$; $r= 0,39$); CM e CM FPG - correlação positiva regular ($p= 0,034$; $r= 0,49$); CM e Necrose - correlação positiva regular ($p= 0,038$; $r= 0,47$); CM endo e CM FPG: Correlação positiva regular ($p= 0,024$; $r= 0,49$); CM endo e necrose - correlação positiva moderada ($p= 0,023$; $r= 0,51$); CM FPG e CM tampão - correlação positiva moderada ($p= 0,012$; $r= 0,63$); CM FPG e GPx - correlação positiva moderada ($p= 0,010$; $r= 0,51$); IDN e MN - correlação positiva regular ($p= 0,036$; $r= 0,35$); Necrose e apoptose - correlação positiva moderada ($p= 0,001$; $r= 0,62$); Necrose e *Bud* - correlação positiva moderada ($p= 0,002$; $r= 0,52$); MN e PNP - correlação positiva regular ($p= 0,043$; $r= 0,35$); Bud e BuChE - correlação positiva regular ($p= 0,037$; $r= -0,35$).

Já as correlações negativas ocorreram entre: CM FPG e MN - correlação negativa regular ($p= 0,020$; $r= -0,48$); CM FPG e AChE - correlação negativa regular ($p= 0,039$; $r= -0,41$); MN e BuChE - correlação negativa regular ($p= 0,012$; $r= -0,41$).

As demais correlações não foram estatisticamente significativas.

Figura 26 – Correlações de variáveis analisadas no grupo extrato, depois da intervenção.



Fonte: elaborado pela autora.

As cores representam as forças de correlação. Quanto mais forte a cor, mais forte a correlação. Em azul estão as correlações positivas; em vermelho estão as correlações negativas – independe do resultado ser ou não significativo. Forças de correlação: valores de ρ ; Valores significativos: valores de p.

4.4.8 microRNAs

Para a realização dos ensaios de *microarray*, inicialmente o RNA total das amostras de soro foi extraído. Na sequência, as amostras que compreenderam 8 amostras controle e 16 amostras de pacientes, foram submetidas a análise de *microarray*, onde foram analisados 2549 miRNAs humanos. Destas análises, 48 miRNAs mostraram-se diferencialmente expressos, como mostrado na Tabela 15.

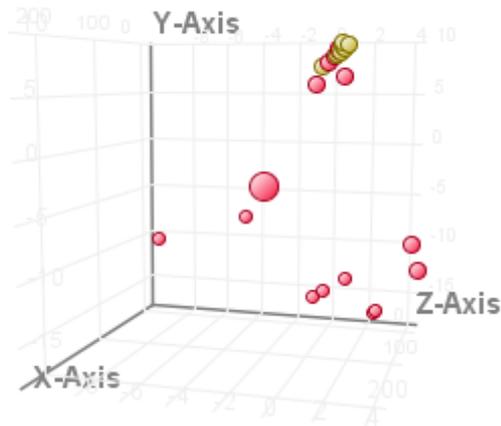
Na Figura 27, encontra-se a análise de componentes principais dos dados de intensidade normalizada, o que demonstra a diferença na intensidade de expressão dos miRNAs, comparando o controle com as amostras. Já a Figura 28, mostra a intensidade de expressão em todas as amostras controle e dos pacientes, onde a cor vermelha indica alta expressão dos miRNAs detectados nas amostras dos pacientes.

Tabela 15: MiRNAs diferencialmente expressos na comparação das amostras controle x amostras de pacientes.

MiRNAs	Valor de p	Regulação	FC (<i>fold change</i>)
hsa-miR-4516	0,0008	<i>up</i>	154
hsa-miR-8069	0,0031	<i>up</i>	142
hsa-miR-486-5p	0,0017	<i>up</i>	103
hsa-miR-4281	0,0017	<i>up</i>	81
hsa-miR-223-3p	0,0009	<i>up</i>	80
hsa-miR-4459	0,0046	<i>up</i>	78
hsa-miR-3960	0,0017	<i>up</i>	75
hsa-miR-22-3p	0,0017	<i>up</i>	67
hsa-miR-16-5p	0,0045	<i>up</i>	65
hsa-miR-19b-3p	0,0017	<i>up</i>	58
hsa-miR-451a	0,0027	<i>up</i>	56
hsa-miR-21-5p	0,0046	<i>up</i>	54
hsa-miR-6869-5p	0,0033	<i>up</i>	47
hsa-miR-4443	0,0033	<i>up</i>	44
hsa-miR-1202	0,0033	<i>up</i>	42
hsa-miR-7107-5p	0,0046	<i>up</i>	42
hsa-miR-15a-5p	0,0033	<i>up</i>	42
hsa-miR-6090	0,0040	<i>up</i>	40
hsa-miR-6087	0,0038	<i>up</i>	39
hsa-miR-197-5p	0,0062	<i>up</i>	37
hsa-miR-328-5p	0,0033	<i>up</i>	35
hsa-miR-4306	0,0062	<i>up</i>	30
hsa-miR-6821-5p	0,0062	<i>up</i>	29
hsa-miR-4687-3p	0,0062	<i>up</i>	29
hsa-miR-6800-5p	0,0062	<i>up</i>	28

hsa-miR-7150	0,0062	<i>up</i>	28
hsa-miR-92a-3p	0,0033	<i>up</i>	28
hsa-miR-3663-3p	0,0062	<i>up</i>	26
hsa-miR-6088	0,0062	<i>up</i>	25
hsa-miR-1273g-3p	0,0062	<i>up</i>	25
hsa-miR-6850-5p	0,0062	<i>up</i>	25
hsa-miR-1207-5p	0,0062	<i>up</i>	24
hsa-miR-6124	0,0033	<i>up</i>	23
hsa-miR-5585-3p	0,0062	<i>up</i>	23
hsa-miR-6740-5p	0,0033	<i>up</i>	23
hsa-miR-6125	0,0062	<i>up</i>	23
hsa-miR-638	0,0062	<i>up</i>	22
hsa-miR-6510-5p	0,0055	<i>up</i>	22
hsa-miR-4763-3p	0,0062	<i>up</i>	21
hsa-miR-6127	0,0062	<i>up</i>	20
hsa-miR-2861	0,0062	<i>up</i>	20
hsa-miR-7847-3p	0,0062	<i>up</i>	19
hsa-miR-3656	0,0062	<i>up</i>	19
hsa-miR-483-5p	0,0033	<i>up</i>	19
hsa-miR-3135b	0,0062	<i>up</i>	18
hsa-miR-3679-5p	0,0062	<i>up</i>	17
hsa-miR-6769b-5p	0,0062	<i>up</i>	15
hsa-miR-4298	0,0062	<i>up</i>	15

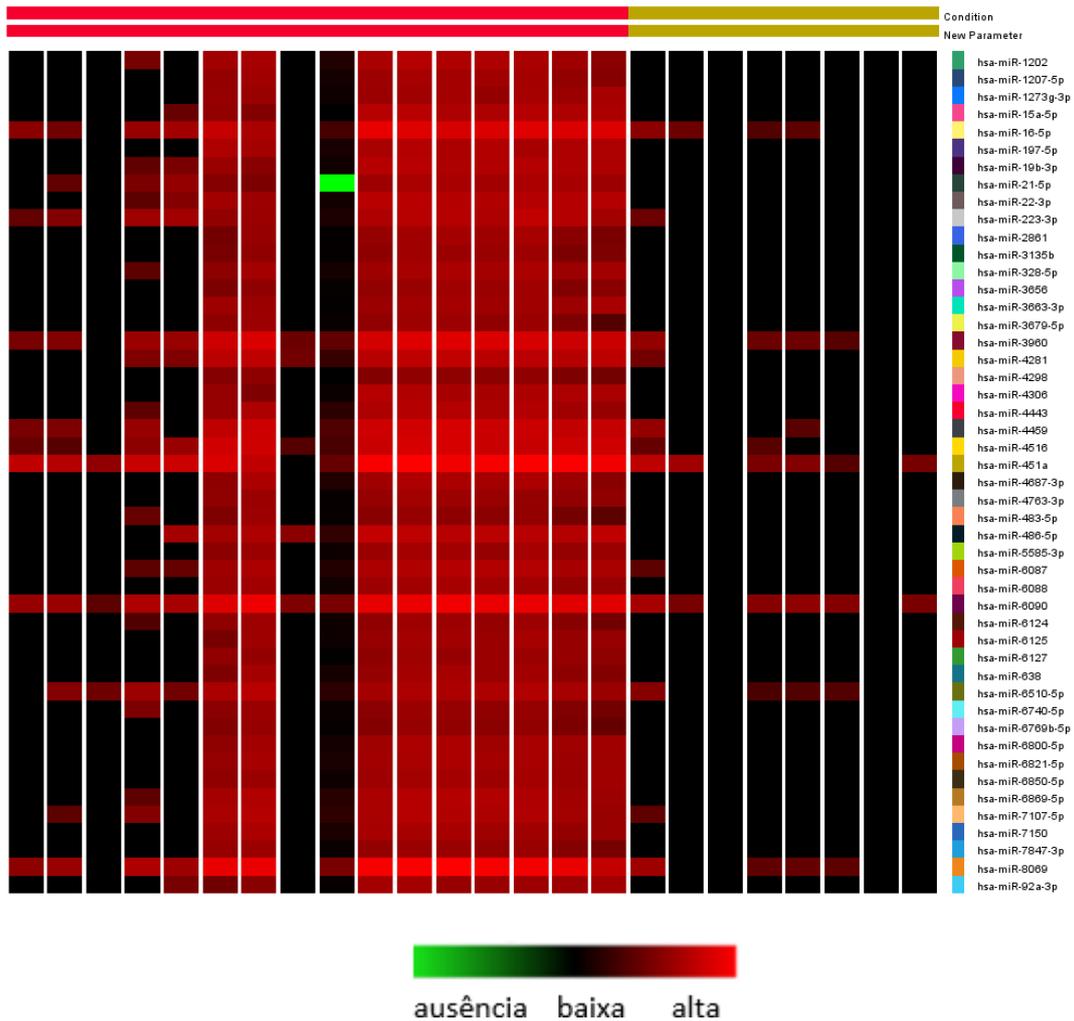
Figura 27 - Análise de componentes principais dos dados de intensidade normalizada.



■ Controle ■ Amostra

Na Figura 27 Os eixos representam os três principais componentes da análise de microarranjo, em relação à variabilidade dos dados.

Figura 28 - Perfil de expressão dos miRNAs diferencialmente expressos entre os controles e as amostras de pacientes.



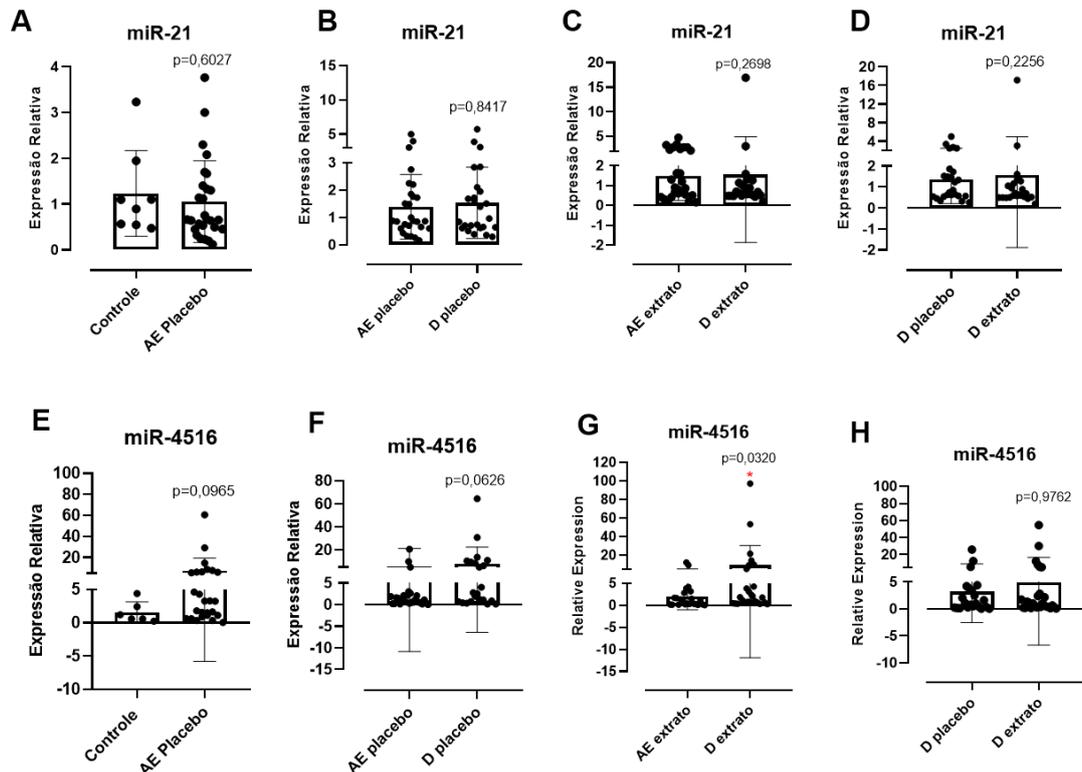
ausência baixa alta

Na Figura 28, no mapa de calor, estão apresentados os valores de intensidade de expressão dos miRNAs diferencialmente expressos com valor de $p < 0,05$ e $FC > 2$. A cor verde indica ausência de expressão, a cor preta indica baixa expressão e a cor vermelha indica alta expressão.

De acordo com os valores de “*fold change*”, os miRNAs escolhidos para validação usando qPCR foram: hsa-miR-4516, hsa-miR-8069, hsa-miR-223-3p, hsa-miR-21-5p, has-miR-3960, has-miR-16-5p, has-miR-451a, has-miR-6090, hsa-miR-33b-3p e hsa-miR-6089, sendo os 2 últimos escolhidos como controle endógeno. De acordo com os resultados iniciais da PCR, mesmo utilizando diferentes diluições do RNA, não houve expressão dos seguintes miRNAs: hsa-miR-8069, has-miR-3960, has-miR-6090, e os que foram escolhidos como controles endógenos hsa-miR-33b-3p e hsa-miR-6089. Assim, continuaram os ensaios com os demais miRNAs escolhidos, usando o miRNA has-miR-16-5p como controle endógeno para as análises pois este mostrou-se estável e é um miRNA comumente utilizado como normalizador quando utilizado amostra de soro humano.

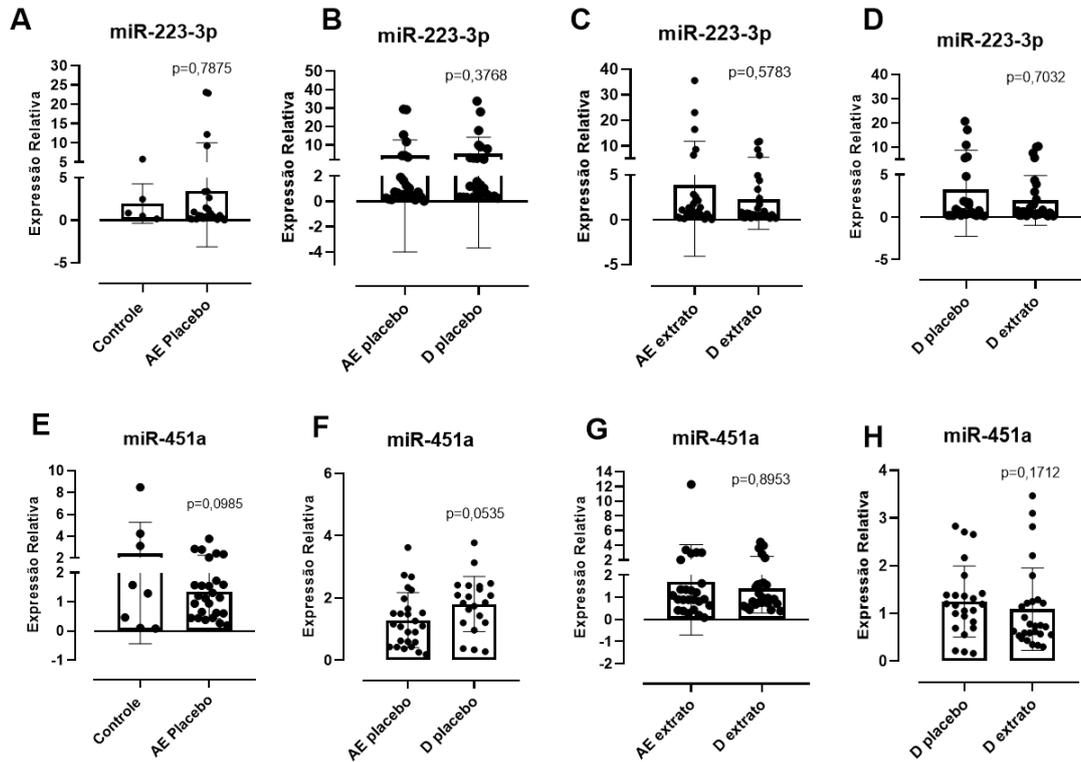
De acordo com os resultados mostrados nas Figuras 29 e 30, houve diferença significativa na expressão do miRNA-4516, que aumentou após a intervenção.

Figura 29 - Expressão relativa do miR-21 (A-D) e miR-4516 (E-H) quando comparadas as amostras.



As amostras da Figura 29 analisadas foram: Controle x AE placebo; AE placebo x D placebo, AE extrato x D extrato, e D placebo x D extrato. * $p < 0,05$, para análise dos dados foi utilizado o teste de *Mann-Whitney*.

Figura 30 - Expressão relativa do miR-223-3p e miR-451a quando comparadas as amostras.



As amostras analisadas na Figura 30 foram: Controle x AE placebo; AE placebo x D placebo, AE extrato x D extrato, e D placebo x D extrato. * $p < 0,05$, para análise dos dados foi utilizado o teste de *Mann-Whitney*.

5 DISCUSSÃO

Agentes tóxicos ambientais aumentam a idade biológica, além de facilitar o desenvolvimento e a progressão de doenças relacionadas à idade. O sistema cardiovascular e o sistema nervoso central são os mais atingidos. Aumento de estresse oxidativo, comprometimento da função mitocondrial, danos ao DNA e inflamação são fatores associados à idade e exacerbados pela exposição à agrotóxicos (PANDICS et al., 2023).

A estimulação dos mecanismos de defesa do genoma pode ser uma estratégia promissora para aumentar a expectativa de vida, e prevenir o desenvolvimento de doenças relacionadas à danos ao DNA e à idade. Algumas maneiras de atingir esse objetivo: 1) Prevenção de danos ao DNA, por meio da estimulação de sistemas antioxidantes e de desintoxicação, assim como quelação de metais de transição; 2) Regulação de modificações epigenéticas: metilação do DNA, modificação de histonas, atividade de microRNAs; 3) Melhorar a resposta e o reparo de danos no DNA; 4) Remoção seletiva de células não funcionais e senescentes. As fontes de danos ao DNA e mutagênese são resultado da associação de fatores externos (incluindo agentes físicos e químicos, além de infecções virais) e causas intracelulares (como reações hidrolíticas espontâneas, conversão de citosina metilada em timina, espécies reativas de oxigênio, peroxidação lipídica, erros de replicação de DNA e de reparo de DNA) (PROSHKINA et al., 2020; SCHUMACHER et al., 2021).

5.1 DANO DE DNA

O câncer pode ser induzido por vários fatores, endógenos e exógenos. Fatores endógenos incluem incompatibilidades de DNA (causadas por erros de DNA polimerase durante a replicação, e instabilidade genética causada por desaminação espontânea, depurinação e depirimidinação de bases de DNA). Fatores exógenos incluem exposição a compostos mutagênicos (como consumo de tabaco e álcool), nutrição, estresse, radiação ultravioleta e espécies reativas de oxigênio (ROS), que induzem mudanças estruturais no DNA, modificando bases de nucleotídeos, induzindo quebras de fita de DNA, ligações cruzadas inter e intra-fitas, e ligações cruzadas DNA-proteína. Além disso, o estresse oxidativo está envolvido em todos os estágios do câncer; pode ativar uma série de vias de transdução de sinal que transcrevem genes reguladores do crescimento celular, e pode ainda induzir

mutações e danos ao DNA (pela liberação de ROS, que oxidam as bases do DNA) (BOUYAHYA et al., 2022).

A idade é um fator que favorece a redução da eficiência dos mecanismos de reparo de DNA, um acúmulo de células senescentes e de danos oxidativos, bem como um estado de inflamação crônica de baixo grau. Radicais livres causam quebras de DNA. A guanina é uma base que sofre intenso ataque oxidativo quando há altos níveis de radicais livres, formando a 8-oxodG.

A enzima FPG detecta purinas oxidadas, como a guanina. A suplementação com o extrato de Masquelier® OPCs reduziu o índice de dano total detectado com essa enzima, o que sugere que a intervenção reduziu o dano oxidativo no DNA.

A presença de micronúcleos (derivados de quebras ou perdas cromossômicas) e pontes nucleoplasmáticas (derivadas de reparo incorreto de DNA), assim como uma menor viabilidade celular pela presença de células necróticas e apoptóticas, refletem a instabilidade cromossômica e o potencial mutagênico causados pela exposição à agentes genotóxicos.

A intervenção com o extrato de Masquelier® OPCs diminuiu a frequência de micronúcleos e de pontes nucleoplasmáticas, o que sugere a sua capacidade em modular estabilidade genômica e proteger contra a progressão de doenças, como o câncer. Essa suplementação diminuiu ainda a frequência de apoptose, o que se relaciona com redução da toxicidade induzida por agrotóxicos, tornando as células metabolicamente mais ativas.

5.2 ESTRESSE OXIDATIVO

Um dos mecanismos básicos para prevenir danos às macromoléculas celulares é o sistema de defesa antioxidante. O estresse oxidativo leva à um aumento relacionado à idade no nível celular de macromoléculas oxidadas, incluindo o DNA, e esse aumento está associado a várias condições patológicas, como envelhecimento, carcinogênese, doenças neurodegenerativas e cardiovasculares. Esta condição é neutralizada pelo sistema de defesa antioxidante, que inclui o enzimático (como SOD, CAT, GPx) e o não enzimático (como os compostos fenólicos) (PROSHKINA et al., 2020; RUSSO et al., 2020; SCHUMACHER et al., 2021).

A atividade das enzimas antioxidantes reduz durante o processo de envelhecimento, enquanto os níveis de radicais livres e os danos oxidativos ao DNA

tornam-se aumentados. Quanto maior a exposição à agentes agressores ao longo da vida, maior o acúmulo de danos. Com a idade, há uma diminuição na atividade catalítica das proteínas de reparo do DNA; BER, NER, MMR, DSB, SSB, NHEJ, HR. Tais mudanças são combinadas não apenas com uma capacidade reduzida de reparar regiões danificadas, mas também com um aumento na frequência de erros de reparo, devido à coordenação prejudicada desse processo (PROSHKINA et al., 2020; SCHUMACHER et al., 2021).

O estresse oxidativo está diretamente ligado a causa e à progressão do câncer. Mas as medições em humanos ainda é complexa, e os dados referentes à exposição à agrotóxicos ainda são conflitantes.

Era esperado que o GPx, uma enzima antioxidante endógena, aumentasse a sua expressão após a intervenção; mas ela não apresentou diferença significativa. Além disso, ela mostrou uma correlação positiva regular com a idade dos participantes, e também com a relação neutrófilo /linfócito, conforme o item 4.4.6 (antes do extrato). Era esperado o contrário em ambas correlações, uma vez que a expressão de enzimas antioxidantes tende a reduzir com o avanço da idade, e a relação neutrófilo /linfócito se correlaciona com doenças de perfil inflamatório crônico. E finalmente, conforme o item 4.4.7 (depois do extrato), também de forma inesperada, apresentou ainda uma correlação positiva moderada com o índice de dano de DNA no ensaio cometa com FPG.

5.3 ALTERAÇÕES IMUNOLÓGICAS

Danos no DNA induzem uma resposta celular que promove a alteração de vias de sinalização; pode induzir senescência e apoptose celular, disfunção mitocondrial, desregulação de autofagia; desregulação da imunidade inata e aumento de inflamação. O aumento da instabilidade genômica leva à uma mudança na transcrição de genes e interrupção do metabolismo celular, levando ao acúmulo de células disfuncionais e heterogeneidade genética, ruptura do potencial regenerativo e funções fisiológicas dos tecidos. Por exemplo, danos ao DNA em macrófagos, aumenta a inflamação; nos neurônios, leva ao comprometimento cognitivo; o acúmulo de danos no DNA e mutações em células-tronco influencia o seu potencial regenerativo, e aumenta o risco de replicação de células-tronco tumorais (PROSHKINA et al., 2020; SCHUMACHER et al., 2021).

As células T CD8+ tendem a estar aumentadas por exposição à xenobióticos; se relacionam com o aumento de radicais livres, estresse oxidativo, inflamação e desregulação do sistema imunológico.

As células T CD4+ tendem a estar reduzidas quando há uma maior exposição aos agrotóxicos, uma vez que se relacionam com uma maior organização e eficiência do sistema imunológico. A suplementação com o extrato de Masquelier® OPCs aumentou a expressão das células T CD4+, o que sugere o seu potencial em favorecer a regulação de processos inflamatórios, respostas homeostáticas e adaptativas.

O aumento da relação T CD4+ /T CD8+ indica atividade imunológica mais eficiente. Serve ainda como um marcador de redução de imunotoxicidade, induzida por xenobióticos. O extrato de Masquelier® OPCs aumentou essa relação, o que sugere não apenas a sua capacidade de regulação de resposta imune, mas também de regulação de imunosenescência.

5.4 ALTERAÇÕES TOXICOLÓGICAS

A senescência celular é uma parada do ciclo celular que limita o potencial proliferativo das células; as células senescentes estão envolvidas em várias condições fisiológicas e patológicas, como supressão tumoral, desenvolvimento embrionário e reparo tecidual. Contribui para o envelhecimento de todo o organismo, reduzindo o potencial regenerativo dos tecidos (pois depleta células-tronco) e induz inflamação crônica (como consequência do fenótipo secretor associado à senescência, o SASP) (PROSHKINA et al., 2020; RUSSO et al, 2020; SCHUMACHER et al., 2021).

A população estudada é exposta constantemente à xenobióticos, sobretudo inseticidas e fungicidas. A exposição ocupacional à esses agentes se acumula de forma exposição-dependente e tempo-dependente, aumentando níveis de danos citogenéticos. Assim, quanto maior a idade dos agricultores, e quanto maior o tempo e o grau de exposição, maiores os níveis de senescência celular, de danos genômicos e de doenças relacionadas à inflamação.

A AChE é produzida sobretudo em hemácias, tecido nervoso e músculos; tem meia vida de 3 meses, e relaciona-se sobretudo com intoxicação crônica à agrotóxicos. A BuChE está presente principalmente no fígado, no plasma, no pâncreas, no intestino delgado, e ainda no sistema nervoso (central e periférico); tem

meia vida de uma semana, e por isso é um biomarcador sobretudo de intoxicação aguda (GEORGINO et al., 2005).

Inseticidas são inibidores de colinesterases; podem induzir o acúmulo de ACh, alterando a contração muscular (induzindo por exemplo, tremores e espasmos), além de tonturas, zumbidos no ouvido ou perda de audição – e esses sintomas foram largamente relatados, por diversos agricultores.

A atividade da AChE e da BuChE depende de fatores como sexo, etnia e faixa etária dos indivíduos, além de doenças que eles apresentem. Dessa forma, a atividade enzimática pode estar aumentada, por exemplo, em pessoas com obesidade e doenças relacionadas à obesidade, largamente relatadas pelos participantes do estudo.

Conforme os itens 4.4.6 e 4.4.7, há uma correlação positiva regular entre o IMC e a BuChE dos participantes. Como a intervenção com o extrato de Masquelier® OPCs reduziu a atividade da BuChE, isso poderia sugerir um potencial do extrato em modular doenças crônicas de perfil inflamatório (como obesidade, e doenças relacionadas à obesidade, como diabetes, doenças cardiovasculares, e câncer), assim como sintomas clínicos induzidos por agrotóxicos (como tremores e espasmos).

Fungicidas interferem na metabolização de xenobióticos, aumentando o seu tempo de meia vida, e reduzindo a sua capacidade de eliminação celular. Pelo fato da BuChE ser um biomarcador de exposição à agrotóxicos, a redução da BuChE induzida pelo extrato poderia ainda sugerir uma depuração mais eficiente dos agrotóxicos pelo organismo, sugerindo que possa reduzir a toxicidade gerada por esses agentes estressores.

A AChE é um biomarcador de efeito à esses agentes químicos. A BuChE pode ainda atuar substituindo a AChE na degradação da acetilcolina, quando a AChE está inibida.

5.5 microRNAs

Estresse e dano celular, inflamação, e morte celular necrótica, induzem a liberação de moléculas endógenas de padrão molecular associado ao dano (DAMP), que ativam a resposta imune. No entanto, a desregulação e persistência dessas moléculas, induz inflamação crônica associada à carcinogênese, uma vez que a inflamação crônica também libera radicais livres e aldeídos, que induzem mutações

genéticas e modificações pós-traducionais de proteínas relacionadas ao câncer. As modificações epigenéticas constituem outro fator que desempenha um papel crucial na carcinogênese. O epigenoma do câncer sofre uma mudança geral em sua programação (incluindo metilação do DNA, interrupções nos padrões de modificação pós-traducional de histonas, alterações na remodelação da cromatina e desregulação da expressão de microRNAs) (BOUYAHYA et al., 2022).

As exposições ambientais como fumo, álcool, agrotóxicos, associados ainda à doenças, idade e sexo do indivíduo, afetam diretamente a maneira como os genes se expressam. Podem favorecer o desenvolvimento de doenças neurológicas e sistêmicas de perfil inflamatório.

MicroRNAs são um dos mecanismos epigenéticos que controlam a expressão dos genes, regulando por exemplo, o sistema imunológico, o sistema antioxidante, e a função das proteínas. Pesticidas podem influenciar a atividade dos microRNAs, favorecendo inclusive doenças como o câncer.

O miR-4516 é um potencial biomarcador de alguns tipos de câncer (WANG; Xu, 2020) e de doenças inflamatórias, como as cardiovasculares, incluindo infarto (LIU et al., 2023). Era esperado que a intervenção reduzisse a expressão desse microRNA, mas não foi o que aconteceu, conforme a Figura 30 (G). Contudo, a sua expressão foi bastante semelhante à antes da suplementação; o grupo extrato já tinha uma alta expressão de miR-4516, e a suplementação não foi capaz de reduzir, na dose e durante o período de tempo em que foi utilizada.

Uma das possibilidades de isso ter acontecido foi o fato da escolha dos miRNAs ter sido a partir da análise cega (grupos placebo e extrato juntos), dificultando a precisão da escolha. Já as análises a respeito do antes e depois da intervenção foram feitas, é claro, apenas com o grupo extrato, o que não seria o delineamento ideal para o estudo. Uma nova escolha de miRNAs a partir apenas da análise do grupo extrato teve inviabilidade de custos para ser realizada.

5.6 ANTIOXIDANTES, OPCs E MASQUELIER®

Antioxidantes exógenos favorecem a atividade de antioxidantes endógenos, além de aumentarem os mecanismos de defesa celular, incluindo o funcionamento de enzimas, cofatores e homeostase de vias e sinalização celular, como as antioxidantes

e as de desintoxicação celular (incluindo Nrf2/ARE) (PROSHKINA et al., 2020; RUSSO et al., 2020; SCHUMACHER et al., 2021).

O extrato de semente de uva rico em proantocianidinas (GSPE) é conhecido pelos seus efeitos em ativar Nrf2, assim como aumentar a expressão de enzimas antioxidantes, como SOD, CAT, GPx e aumentar níveis circulantes de GSH. Mantém ainda o comprimento de telômeros, e assim, protege o DNA, reduzindo danos causados por agentes genotóxicos – a transformação maligna ocorre sobretudo em células com telômeros com encurtamento acelerado e com organização estrutural prejudicada. O GSPE reduz danos ao DNA também por regulação epigenética, modulando a expressão de miRNAs (como por exemplo, o miR-153, reduzindo a sua expressão; quando aumentado, o mi-R153 reduz a expressão e a atividade de Nrf2). Além disso, favorece o aumento da expressão de genes de reparo de DNA (como XPA, XPC, DDB2, RPA1) (PROSHKINA et al., 2020).

A suplementação com o extrato de Masquelier® OPCs na dosagem de 200 mg ao dia, por 8 semanas, em indivíduos expostos à agrotóxicos:

- Reduziu o índice de dano total com a enzima FPG no ensaio cometa, o que sugere que a intervenção reduziu o dano oxidativo no DNA;
- Diminuiu a frequência de micronúcleos, de pontes nucleoplasmáticas e de apoptose no CBMN, o que sugere a sua capacidade em modular estabilidade genômica, proteger contra a progressão de doenças como o câncer, e reduzir a toxicidade induzida por agrotóxicos;
- Aumentou a expressão das células T CD4+, o que sugere uma maior organização e eficiência do sistema imunológico;
- Aumentou a relação de células T CD4+/ T CD8+, o que sugere redução de imunotoxicidade, maior regulação do sistema imunológico e modulação de imunosenescência;
- Reduziu a atividade da BuChE, o que sugere a sua capacidade em reduzir a toxicidade gerada por agrotóxicos, uma depuração mais eficiente dos agrotóxicos pelo organismo e modular os sintomas clínicos de doenças de perfil inflamatório;
- Não apresentou efeitos estatisticamente significativos: no índice de dano total sem enzimas, com endonuclease, e com tampão no ensaio cometa; no índice mitótico, na necrose e em *buds* no CBMN; no GPx;

na relação neutrófilos /linfócitos; na AChE. Além disso, aumentou a expressão do miR-4516. Nesses parâmetros seria interessante avaliar dosagens maiores da suplementação, e /ou uma intervenção por um período de tempo mais longo.

6 CONCLUSÃO

O extrato de Masquelier® OPCs, suplementado por agricultores expostos a agrotóxicos, na dosagem de 200 mg ao dia, por 8 semanas: reduziu o dano oxidativo no DNA medido pelo ensaio cometa com a enzima FPG. A frequência de micronúcleos, pontes nucleoplasmáticas e apoptose também se apresentaram reduzidas após a administração do extrato. A atividade do sistema imunológico melhorou, aumentando células T CD4+ e a relação T CD4+ /T CD8+. A atividade da BuChE reduziu, sugerindo redução da toxicidade e do acúmulo de xenobióticos no organismo, bem como a modulação de doenças de perfil inflamatório.

Os resultados desse estudo abriram um leque de possibilidades de futuras investigações que devem ser feitas na sequência desse trabalho, como: 1) avaliar outros marcadores no grupo extrato, sobretudo em relação ao estresse oxidativo, às alterações imunológicas, e à atividade de microRNAs; 2) avaliar os mesmos parâmetros analisados nesse estudo (danos ao DNA, marcadores bioquímicos, marcadores toxicológicos, marcadores imunológicos e microRNAs), antes e depois da administração do placebo; 3) comparar um grupo com o outro (placebo e extrato), antes e após a intervenção clínica; 4) avaliar a resposta de ambos os sexos, de acordo com cada faixa etária, em relação à suplementação com o extrato de semente de uva, considerando cada uma das variáveis: tempo de exposição a pesticidas; uso de EPIs; modo de aplicação dos agrotóxicos; consumo de álcool; doenças que apresentam.

Intervenções clínicas futuras poderiam avaliar dosagens e períodos de tempo maiores dessa suplementação em agricultores, a fim de reavaliar os parâmetros que não deram diferenças significativas, ou que deram diferenças conflitantes com o esperado nesse estudo.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-SALAM, O. M. E. et al. Grape Seed Extract Alone or Combined with Atropine in Treatment of Malathion Induced Neuro- and Genotoxicity. **J Nanosci Nanotechnol**, v. 18, n. 1, p. 564-575, 2018.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA)**. Relatório de atividades. <https://www.gov.br/anvisa/pt-br> (acesso em 02/09/2021).
- ALI, S. et al. Understanding oxidants and antioxidants: Classical team with new players. **J Food Biochem**, v. 44, n. 3, p. e13145, 2020.
- AZQUETA, A. et al. DNA repair as a human biomonitoring tool: Comet assay approaches. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v. 781, n. March, p. 71–87, 2019.
- BARBIER, A. M. et al. Activité angioprotectrice des oligomères procyanidoliques chez l'animal. **Toulouse: Congrès International d'Angiologie**, 1988.
- BASHIR, N. et al. The molecular and biochemical insight view of grape seed proanthocyanidins in ameliorating cadmium-induced testes-toxicity in rat model: implication of PI3K/Akt/Nrf-2 signaling. **Biosci Rep**, v. 39, n. 1:BSR20180515, 2019.
- BIRBEN, E. et al. Oxidative stress and antioxidant defense. **The World Allergy Organization Journal**, v. 5, n. 1, p. 9–19, 2012.
- BISWAS, S. K. Does the Interdependence between oxidative stress and inflammation explain the antioxidant paradox? **Ox Med Cell Longev**, 5698931, 2016.
- BLAZSO, G.; GABOR, M. Oedema-inhibiting effect of procyanidin. **Acta Physiol Acad Sci Hung**, n. 56, p. 235–240, 1980.
- BOLOGNESI, C.; HOLLAND, N. The use of lymphocyte cytokinesis-block micronucleus assay for monitoring pesticide-exposed populations. **Mutat Res**, n. 770, p. 183-203, 2016.
- BONASSI, S. et al. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. **Carcinogenesis**, n. 28, p. 625-631, 2007.
- BOUYAHYA, A. et al. Natural Bioactive Compounds Targeting Histone Deacetylases in Human Cancers: Recent Updates. **Molecules**, v. 27, n. 8:2568, 2022.
- BURLINSON, B. et al. Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: Results of the in vivo Comet assay workgroup. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 627, n. 1, p. 31–35, 2007.
- BUYUKOKUROGLU, M.E. et al. Antioxidant role of melatonin in organophosphate toxicity in rats. **Cell Biol Toxicol**, n. 24, p. 151-158, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. Portaria nº 1.823, de 23 de agosto de 2012. Instituição a Política Nacional de Saúde do Trabalhador e da Trabalhadora. Brasília (DF): **Diário Oficial da União**, 2012.

CANKAYALI, I. et al. The effect of N-acetylcysteine on oxidative stress in organophosphate poisoning model. **Adv Ther**, n. 22, p. 107-116, 2005.

CASIDA, J. E.; DURKIN, K. A. Pesticide Chemical Research in Toxicology: Lessons from Nature. **Chem Res Toxicol**, v. 30, n. 1, p. 94-104, 2017.

CATTELAN, M. D. P. et al. Occupational exposure to pesticides in family agriculture and the oxidative, biochemical and hematological profile in this agricultural model. **Life Sci**, n. 203, p. 177–183, 2018.

CHEDEA, V. S. et al. Antioxidant/Pro-Oxidant Actions of Polyphenols From Grapevine and Wine By-Products-Base for Complementary Therapy in Ischemic Heart Diseases. **Front Cardiovasc Med**, v. 3, n. 8:750508, 2021.

CHEN, Z. et al. Oxidative stress activates endothelial innate immunity via sterol regulatory element binding protein 2 (SREBP2) transactivation of MicroRNA-92a. **Circulation**, n. 131, p. 805- 814, 2015.

CHIKARA, S. et al. Oxidative stress and dietary phytochemicals: Role in cancer chemoprevention and treatment. **Cancer Lett**, v. 28, n. 413, p. 122-134, 2018.

CHOU, D. M. et al. A chromatin localization screen reveals poly (ADP ribose)-regulated recruitment of the repressive polycomb and NuRD complexes to sites of DNA damage. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 107, n. 43, p. 18475–18480, 2010.

COLATO, A. et al. Impact of aerobic water running training on peripheral immune-endocrine markers of overweight-obese women. **Sci Sports**, n. 32, p. 46-53, 2016.

COLLINS, A. R. Measuring oxidative damage to DNA and its repair with the comet assay. **Biochim Biophys Acta**, v. 1840, n. 2:794-800, 2014.

COLLINS, A. R. The comet assay for DNA damage and repair. **Mol Biotechnol**, v. 26, n. 3, p. 249, 2004.

CORSINI, E. et al. Effects of pesticide exposure on the human immune system. **Hum Exp Toxicol**, v. 27, n. 9, p. 671-680, 2008.

COS, P. et al. Proanthocyanidins in health care: current and new trends. **Curr Med Chem**, n. 11, p. 1345-1359, 2004.

COSTA, C. et al., New insights on 'old' toxicants in occupational toxicology (Review). **Mol Med Rep**, v. 15, n. 5, p. 3317–3322, 2017.

COSTA, M. B. et al. Chromosomal abnormalities and dysregulated DNA repair gene expression in farmers exposed to pesticides. **Environ Toxicol Pharmacol**, 82:103564, 2021.

CUNHA, C. et al. Citometria de Fluxo: Imunofenotipagem e Avaliação da Produção de Citocinas, curso de verão **Instituto Oswaldo Cruz**, 2012.

CURL, C. L. et al. Synthetic Pesticides and Health in Vulnerable Populations: Agricultural Workers. **Curr Environ Health Rep**, v. 7, n. 1, p. 13-29, 2020.

CURTIN, N.J. DNA repair dysregulation from cancer driver to therapeutic target. **Nat Rev Cancer**, v. 12, n. 12, p. 801-817, 2012.

DALMOLIN, S. P. et al. Biomarkers of occupational exposure to pesticides: Systematic review of insecticides. **Environ Toxicol Pharmacol**, 75:103304, 2020.

DAMALAS, C. A. et al. Eleftherohorinos IG. Pesticide exposure, safety issues, and risk assessment indicators. **Int J Environ Res Public Health**, v. 8, n. 5, p. 1402-1419, 2011.

da SILVA, P. F. L.; SCHUMACHER, B. DNA damage responses in ageing. **Open Biol**, v. 9, n. 11:190168, 2019.

de-ASSIS, M. P. et al. Health problems in agricultural workers occupationally exposed to pesticides. **Rev Bras Med Trab**, v. 18, n. 3, p. 352-363, 2021.

de-CARVALHO, A. et al. Citometria de Fluxo no estudo das doenças infecto-parasitárias. Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular; Pós-Graduação em Biologia Parasitária, curso de inverno **Instituto Oswaldo Cruz**, 2010.

DHOUIB, I. et al. 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.

FENECH, M. et al. A systematic review of the association between occupational exposure to formaldehyde and effects on chromosomal DNA damage measured using the cytokinesis-block micronucleus assay in lymphocytes. **Mutat Res**, n. 770, p. 46-57, 2016a.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nature Protocols**, v. 2, n. 5, p. 1084–1104, 2007.

FENECH, M. et al. Molecular mechanisms by which in vivo exposure to exogenous chemical genotoxic agents can lead to micronucleus formation in lymphocytes in vivo and ex vivo in humans. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v. 770, p. 12–25, 2016.

FENECH, M.; MORLEY, A. A. Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of in vivo ageing and low dose X-irradiation. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 161, n. 2, p. 193–198, 1986.

FENECH M. The micronucleus assay determination of chromosomal level DNA damage. **Methods Mol Biol**, n. 410, p. 185-216, 2008.

FENECH, M. et al. The HUMN and HUMNxl international collaboration projects on human micronucleus assays in lymphocytes and buccal cells- past, present and future. **Mutagenesis**, n. 26, p. 239-245, 2011.

FINE, A. M. Oligomeric proanthocyanidin complexes: history, structure, and phytopharmaceutical applications. **Altern Med Rev**, n. 5, p. 144-151, 2000.

FRIEDBERG, E. C. A brief history of the DNA repair field. **Cell Research**, v. 18, n. 1, p. 3–7, 2008.

FRIJHOFF, J. et al. Clinical Relevance of Biomarkers of Oxidative Stress. **Antioxid Redox Signal**, v. 23, n. 14, p. 1144–1170, 2015.

GAJSKI, G. et al. The comet assay in animal models: from bugs to whales – (part 1 invertebrates). **Mutat Res Rev Mutat Res**, n. 779, p. 82-113, 2019.

GANGEMI, S. et al. Occupational and environmental exposure to pesticides and cytokine pathways in chronic diseases (Review). **Int J Mol Med**, n. 38, p. 1012-1020, 2016.

GENUIS, S. J.; KYRILLOS, E. The chemical disruption of human metabolism. **Toxicol Mech Methods**, v. 27, n. 7, p. 477-500, 2017.

GEORGINO, H. O. et al. Importância da linha de base pré-exposição das colinesterases (ChES) no controle ocupacional a praguicidas organofosforados e carbamatos. **Rev Bras Toxicol**, v. 18, n. 1, p. 43 – 48, 2005.

GHAFOUR-RASHIDI, Z. et al. Protection by cAMP and cGMP phosphodiesterase inhibitors of diazinon-induced hyperglycemia and oxidative/nitrosative stress in rat Langerhans islets cells: molecular evidence for involvement of non-cholinergic mechanisms. **Pesticide Biochem Physiol**, n. 87, p. 261-270, 2007.

GUNASEKARANA, V. et al. A comprehensive review on clinical applications of comet assay. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 9, n. 3, p. GE01–GE05, 2015.

GUNEY, M. et al. Evaluation of caspase apoptosis during methyl parathion-induced endometrial damage in rats: ameliorating effect of vitamins E and C. **Environ Toxicol Pharmacol**, n. 23, p. 221-227, 2007.

GUYTON, K. Z. et al. Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate. **Lancet Oncol**, v. 16, n. 5, p. 490-491, 2015.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **Br J Pharmacol**, v. 142, n. 2, p. 231–255, 2004.

HUMPHREY, K. M. et al. Establishing a role for environmental toxicant exposure induced epigenetic remodeling in malignant transformation. **Semin Cancer Biol**, n. 57, p. 86-94, 2019.

IARC - Monografias sobre a Avaliação de Riscos Carcinogênicos para Humanos. **Relatório do grupo consultivo para recomendar prioridades para monografias da IARC (2015–2019)**. Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer Lyon, 2014.

IGLESIA, R. de la et al. Healthy properties of proanthocyanidins. **Biofact**, n. 36, p. 159-168, 2010.

KAHL, V. F. S. et al. Base excision repair (OGG1 and XRCC1) and metabolism (PON1) gene polymorphisms act on modulation of DNA damage and immune parameters in tobacco farmers. **Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen**, n. 836(Pt B), p. 9-18, 2018a.

KAHL, V. F. S. et al. Role of PON1, SOD2, OGG1, XRCC1, and XRCC4 polymorphisms on modulation of DNA damage in workers occupationally exposed to pesticides. **Ecotoxicol Environ Saf**, n. 159, p. 164–171, 2018.

KRTOLICA, A. et al. Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. **Proc Natl Acad Sci, USA** n. 98, p. 12072–12077, 2001.

LIMA, G. P. et al. Organic and conventional fertilisation procedures on the nitrate, antioxidants and pesticide content in parts of vegetables. **Food Addit Contam Part B Surveill**, n. 5, p. 188-193, 2012.

LI, D. et al. Reactive Oxygen Species as a Link between Antioxidant Pathways and Autophagy. **Oxid Med Cell Longev**, 2021:5583215, 2021.

LI, J. et al. Reciprocal activation between IL-6/STAT3 and NOX4/Akt signalings promotes proliferation and survival of non-small cell lung cancer cells. **Oncotarget**, v. 6, n. 2, p. 1031– 1048, 2015.

LI, M. et al., MicroRNAs and their role in environmental chemical carcinogenesis. **Environ Geochem Health**, 2018.

LIU, B. et al. Grape seed procyanidin extract ameliorates lead-induced liver injury via miRNA153 and AKT/GSK-3 β /Fyn-mediated Nrf2 activation. **J Nutr Biochem**, n. 52, p. 115-123, 2018.

LIU, P. et al. Exosomal microRNA-4516, microRNA-203 and SFRP1 are potential biomarkers of acute myocardial infarction. **Mol Med Rep**, v. 27, n. 6, p. 124, 2023.

LOPES, C. A.; ALBUQUERQUE, G. C. Agrotóxicos e seus impactos na saúde humana e ambiental. **Saúde Debate**, n. 42, p. 518-534, 2018.

LOPES, C. A.; ALBUQUERQUE, G. C. Desafios e avanços no controle de resíduos de agrotóxicos no Brasil: 15 anos do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos. **Cad Saude Publica** v. 37, n. 2:e00116219, 2021.

LÓPEZ-OTIN, C. et al. Hallmarks of aging: An expanding universe. **Cell**, v. 186, n. 2, p. 243 – 278, 2023.

LÓPEZ-OTIN, C. et al. The hallmarks of aging. **Cell**, n. 153, p. 1194–1217, 2013.

LOZANO-PANIAGUA, D. et al. Biomarkers of oxidative stress in blood of workers exposed to non-cholinesterase inhibiting pesticides. **Ecotoxicol Environ Saf**, n. 162, p. 121–128, 2018.

LUKASZEWICZ-HUSSAIN, A.; MONIUSZKO-JAKONIUK, J. The influence of pretreatment with N-acetylcysteine on serum cholinesterase activity and liver glutathione level in rats intoxicated with chlorfenvinphos. **Pol J Environ Stud**, v. 13, n.1, p. 69-72, 2004.

LUKASZEWICZ-HUSSAIN, A. Role of oxidative stress in organophosphate insecticide toxicity – short review. **Pestic Biochem Physiol**, n. 98, p. 145-150, 2010.

LUSTER, C. et al. Risk assessment in immunotoxicology. I. Sensitivity and predictability of immune tests. **Fundam Appl Toxicol**, n. 18, p. 200-210, 1992.

MAGRONE et al. Red Grape Polyphenol Oral Administration Improves Immune Response in Women Affected by Nickel-Mediated Allergic Contact Dermatitis. **Endocr Metab Immune Disord Drug Targets**, v. 21, n. 2, p. 374-384, 2021.

MAJIDINIA, M.; YOUSEFI, B. DNA damage response regulation by microRNAs as a therapeutic target in cancer. **DNA Repair**, n. 47, p. 1-11, 2016.

MALAKOTI, F. et al. The cross-talk between signaling pathways, noncoding RNAs and DNA damage response: Emerging players in cancer progression. **DNA Repair (Amst)**, 98:103036, 2021.

MANCINI, M. et al. Grape Seed Components as Protectors of Inflammation, DNA Damage, and Cancer. **Curr Nutr Rep** v. 12, n. 1, p. 141-150, 2023.

MAO, J. T. et al. MicroRNA-19a/b mediates grape seed procyanidin extract-induced anti-neoplastic effects against lung cancer. **J Nutr Biochem**, v. 34, p. 118-125, 2016.

MARX-STOELTING, P. et al. The Connection of Azole Fungicides with Xeno-Sensing Nuclear Receptors, Drug Metabolism and Hepatotoxicity. **Cells**, v. 9, n. 5 p. 1192, 2020.

MASQUELIER, J. Action comparee de divers facteurs vitaminiques P sur l'oxydation de l'acide ascorbique par les ions cuivriques. **Bull Soc Chim Biol (Paris)**, n. 33, p. 302–305, 1951.

MASQUELIER, J. Plant extract with a proanthocyanidins content as therapeutic agent having radical scavenger effect and use thereof, **vol. US4698360 A. USA**; 1987.

MASQUELIER, J. et al. Stabilization du collagene par les oligomeres procyanidoliques. **Acta Ther**, n. 7, p. 101–105, 1981.

MEDITHI, S. et al. Predominant role of antioxidants in ameliorating the oxidative stress induced by pesticides. **Arch Environ Occup Health**, v. 76, n. 2, p. 61-74, 2021.

MICHALAK, M. et al. Bioactive Compounds for Skin Health: A Review. **Nutrients**, v. 13, n. 1, p. 203, 2021.

MIŠÍK, M. et al. Use of the single cell gel electrophoresis assay for the detection of DNA-protective dietary factors: Results of human intervention studies. **Mutat Res Rev Mutat Res**, 791:108458, 2023.

MOLLER, P. The comet assay: ready for 30 more years. **Mutagenesis**, v. 33, n. 1, p. 1-7, 2018.

MOHAMMAD, et al. Effect of 8 weeks' supplementation grape seed extract on insulin resistance in iranian adolescents with metabolic syndrome: A randomized controlled trial. **Diabetes Metab Syndr**, v. 15, n. 1, p. 197-203, 2021.

MUHAMMAD, S. et al. Reactive oxygen species in diabetes-induced vascular damage, stroke, and Alzheimer's disease. **J Alzheimer's Dis: JAD**, v. 16, n. 4, p. 775–785, 2009.

MULLER, G. et al. The inverted CD4:CD8 ratio is associated with gender-related changes in oxidative stress during aging. **Cell Immunol**, n. 296, p. 149-154, 2015.

NADDAFI, M. et al. Sensing of oxidative stress biomarkers: The cardioprotective effect of taurine & grape seed extract against the poisoning induced by an agricultural pesticide aluminum phosphide. **Chemosphere**, n. 287, (Pt 3):132245, 2022.

NANDAKUMAR, V. et al. Multi-targeted prevention and therapy of cancer by proanthocyanidins. **Cancer Lett**, v. 269, n. 2, p. 378-387, 2008.

NANDHAKUMAR, S. et al. Evaluation of DNA damage using single-cell gel electrophoresis (Comet Assay). **J Pharmacol Pharmacother**, v. 2, n. 2, p. 107–111, 2011.

NASCIMENTO, F. A. et al. Evaluation of DNA damage and toxicological methodology development: a bibliometric study. **Hum Exp Toxicol**, n. 39, p. 870–880, 2020.

NASCIMENTO, F. A. et al. Farmers exposed to pesticides have almost five times more DNA damage: a meta-analysis study. **Environ Sci Pollut Res Int**, 2021.

NERSESYAN, A. et al. Recommendations and quality criteria for micronucleus studies with humans. **Mutat Res Rev Mutat Res**, v. 789, 108410, 2022.

NIEDERNHOFER, L. J. et al. Nuclear Genomic Instability and Aging. **Annu Rev Biochem**, v. 20, n. 87, p. 295-322, 2018.

ODAI, T. et al. Effects of Grape Seed Proanthocyanidin Extract on Vascular Endothelial Function in Participants with Prehypertension: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study. **Nutrients**, v. 11, n. 12, 2844, 2019.

OLIVE, P. L.; BANÁTH, J. P. The comet assay: A method to measure DNA damage in individual cells. **Nature Protocols**, v. 1, n. 1, p. 23–29, 2006.

PANDICS, T. et al. Exposome and unhealthy aging: environmental drivers from air pollution to occupational exposures. **Geroscience**, 2023.

PANIS, C. et al. Evidence on Human Exposure to Pesticides and the Occurrence of Health Hazards in the Brazilian Population: A Systematic Review. **Front Public Health**, v. 7; n. 9: 787438, 2022.

PARRA-ARROYO, L. et al. Highly hazardous pesticides and related pollutants: Toxicological, regulatory, and analytical aspects. **Sci Total Environ**, v. 807, Pt 3:151879, 2022.

PIGNATI, W. A. et al. Spatial distribution of pesticide use in Brazil: a strategy for Health Surveillance. **Cien Saude Colet.**, v. 22, n. 10, p. 3281-3293, 2017.

PISOSCHI, A. M. et al. Oxidative stress mitigation by antioxidants - An overview on their chemistry and influences on health status. **Eur J Med Chem**, v. 1, n. 209:112891, 2021.

PROSHKINA, E. et al. Genome-Protecting Compounds as Potential Geroprotectors. **Int J Mol Sci**, v. 21, n. 12:4484, 2020.

QI, Y. et al. Grape seed proanthocyanidin extract ameliorates ionizing radiation-induced hematopoietic stem progenitor cell injury by regulating Foxo1 in mice. **Free Radic Biol Med**, n. 174, p. 144-156, 2021.

RAMOS, J. A. et al. Multi-biomarker responses to pesticides in an agricultural population from Central Brazil. **Sci Total Environ**, 754:141893, 2021.

RAUF, A. et al. Proanthocyanidins: A comprehensive review. **Biomed Pharmacother**, 116:108999, 2019.

RODIER, et al. Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. **Nat Cell Biol**, n. 11, p. 973–979, 2009.

RUDRAPAL, M. et al. Dietary Polyphenols and Their Role in Oxidative Stress-Induced Human Diseases: Insights Into Protective Effects, Antioxidant Potentials and Mechanism(s) of Action. **Front Pharmacol**, v. 14, n. 13: 806470, 2022.

RUSSO et al. Mechanisms of aging and potential role of selected polyphenols in extending healthspan. **Biochem Pharmacol**, n. 173:113719, 2020.

SAPBAMRER, R. et al. A longitudinal follow-up study of oxidative stress and DNA damage among farmers exposed to pesticide mixtures. **Environ Sci Poll Res Int**, v. 26, n. 13, p. 13185–13194, 2019.

SCHUMACHER, B. et al. The central role of DNA damage in the ageing process. **Nature**, v. 592, n. 7856, p. 695-703, 2021.

SELMI, G. R.; TRAPÉ, A. Z. Proteção da saúde de trabalhadores rurais: a necessidade de padronização das metodologias de quantificação da exposição dérmica a agrotóxicos. **Cad Saúde Pública**, n. 30, p. 952-960, 2014.

SEMEN, K. O. et al. Effects of Monomeric and Oligomeric Flavanols on Kidney Function, Inflammation and Oxidative Stress in Runners: A Randomized Double-Blind Pilot Study. **Nutrients**, v. 12, n. 6:1634, 2020.

SHADNIA, S. et al. Protective effect of – tocopherol and N-acetylcysteine on diazinon-induced oxidative stress and acetylcholinesterase inhibition in rats. **Toxicol Methan Meth**, n. 17, p. 109-115, 2007.

SHI, J. et al. Polyphenolics in grape seeds-biochemistry and functionality. **J Med Food**, v. 6, n. 4, p. 291-299, 2003.

SILVA PINTO, B. G. et al. Occupational exposure to pesticides: Genetic danger to farmworkers and manufacturing workers - A meta-analytical review. **Sci Total Environ**, 748:141382, 2020.

SINGH, S. et al. The role of multifunctional drug therapy as an antidote to combat experimental subacute neurotoxicity induced by organophosphate pesticides. **Environ Toxicol**, v. 31, n. 8, p. 1017-26, 2016.

SLAWINSKA, N.; OLAS, B. Selected Seeds as Sources of Bioactive Compounds with Diverse Biological Activities. **Nutrients**, v. 15, n. 1, p. 187, 2022.

STEERENBERG, P. et al. Toxicological evaluation of the immune function of pesticide workers, a European wide assessment. **Hum. Exp. Toxicol**, n. 27, p. 701-707, 2008.

STRATHEARN, K. E. et al. Neuroprotective effects of anthocyanin- and proanthocyanidin-rich extracts in cellular models of Parkinson's disease. **Brain Res**, 1555:60-77, 2014.

SULE, R. O. et al. A Common Feature of Pesticides: Oxidative Stress-The Role of Oxidative Stress in Pesticide-Induced Toxicity. **Oxid Med Cell Longev**, 5563759, 2022.

TACHIBANA, S. et al. Interleukin-6 is required for cell cycle arrest and activation of DNA repair enzymes after partial hepatectomy in mice. **Cell Biosci**, v. 4, n. 1, p. 6, 2014.

THAPA, S. et al. Acetylcholinesterase: A Primary Target for Drugs and Insecticides. **Mini Rev Med Chem**, v. 17, n. 17, p. 1665-1676, 2017.

TONG, H. et al. Immunomodulatory and antitumor activities of grape seed proanthocyanidins. **J Agri Food Chem**, n. 59, p. 11543-11547, 2011.

TUBBS, A.; NUSSENZWEIG, A. Endogenous DNA Damage as a Source of Genomic Instability in Cancer. **Cell**, v. 168, n. 4, p. 644–656, 2017.

VERMEIJ, W. et al. Restricted diet delays accelerated ageing and genomic stress in DNA-repair-deficient mice. **Nature**, n. 537, p. 427–431, 2016.

WANG, Q. et al. Paraquat and MPTP alter microRNA expression profiles, and downregulated expression of miR-17-5p contributes to PQ-induced dopaminergic neurodegeneration. **J Appl Toxicol**, n. 38, p. 665- 677, 2018.

WANG, T. et al. Lymphocyte-based challenge DNA-repair assays for personalized health risk assessment. **Mutat Res Rev Mutat Res**, 790:108427, 2022.

WANG, Z.; Xu, R. lncRNA PART1 Promotes Breast Cancer Cell Progression by Directly Targeting miR-4516. **Cancer Manag Res**, v. 24, n. 12, p. 7753–7760, 2020.

WELDON, B. A. et al. Urinary microRNAs as potential biomarkers of pesticide exposure. **Toxicol Appl Pharmacol**, n. 312, p. 19–25, 2016.

WESELER, A. R.; BAST, A. Masquelier's grape seed extract: from basic flavonoid research to a well-characterized food supplement with health benefits. **Nutr J**, v. 16, n. 1, p. 5, 2017.

WESELER, A. R. et al. Pleiotropic benefit of monomeric and oligomeric flavanols on vascular health--a randomized controlled clinical pilot study. **PLoS One**, v. 6, n. 12, e28460, 2011.

WU, C. et al. Role of AMPK in UVB-induced DNA damage repair and growth control. **Oncogene**, n. 32, p. 2682–2689, 2013.

WU, Y. et al. Molecular mechanisms underlying chronic inflammation-associated cancers. **Cancer Lett**, v. 345, n. 2, p. 164-173, 2014.

VALVERDE, M.; ROJAS, E. Environmental and occupational biomonitoring using the comet assay. **Mutat Res Rev Mutat Res**, n. 681, p. 93-109, 2009.

VAN BRUGGEN, A. C. et al. Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. **Sci Total Environ**, v. 616, n. 617, p. 255-268, 2018.

YIALMAZ, B. et al. Endocrine disrupting chemicals: exposure, effects on human health, mechanism of action, models for testing and strategies for prevention. **Rev Endocr Metab Disord**, v. 21, n. 1, p. 127-147, 2020.

YI, J. Z.; McGEE, J. S. Epigenetic-modifying therapies: An emerging avenue for the treatment of inflammatory skin diseases. **Exp Dermatol**, v. 30, n. 8, p. 1167-1176, 2021.

YIN, H. et al. Oligomeric proanthocyanidins inhibit apoptosis of chondrocytes induced by interleukin-1 β . **Mol Med Rep**, n. 16, p. 4195-4200, 2017.

YOUSEFI, R. et al. Grape seed extract supplementation along with a restricted-calorie diet improves cardiovascular risk factors in obese or overweight adult individuals: A randomized, placebo-controlled trial. **Phytother Res**, v. 35, n. 2, p. 987-995, 2021.

YU, G. et al. Epigenetics in neurodegenerative disorders induced by pesticides. **Genes Environ**, v. 43, n. 1, p. 55, 2021.

YUN, B. et al. Oxidative reactivity across kingdoms in the gut: Host immunity, stressed microbiota and oxidized foods. **Free Radic Biol Med**, n. 178, p. 97-110, 2022.

YURUMEZ, Y. et al. Beneficial effect of N-acetylcysteine against organophosphate toxicity in mice. **Biol Pharmacol Bull**, n. 30, p. 490-494, 2007.

ZHANG, L. et al. Resveratrol exhibits neuroprotection against paraquat-induced PC12 cells via heme oxygenase 1 upregulation by decreasing MiR-136-5p expression. **Bioengineered**, v. 13, n. 3, p. 7065-7081, 2022.

ZHAN, Y. et al. Reactive oxygen species regulate miR-17-5p expression via DNA methylation in paraquat-induced nerve cell damage. **Environ Toxicol**, v. 35, n. 12, p. 1364-1373, 2020.

**ANEXO A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(TCLE)**

Universidade Federal de Santa Catarina
Hospital Universitário – Unidade de Análises Clínicas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I – DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA

Nome: _____

Sexo: () M () F Data de Nascimento: _____

II – DADOS SOBRE A PESQUISA

1. Título da Pesquisa: **Ensaio clínico randomizado duplo-cego para avaliação dos benefícios de MASQUELIER's OPCs em uma população de agricultores exposta a pesticidas no Brasil**

2. Pesquisador Principal: Sharbel Weidner Maluf (Divisão de Análises Clínicas do Hospital Universitário UFSC)

III – EXPLICAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

Você está sendo convidado a participar desta pesquisa, que tem como objetivo avaliar os efeitos do extrato de semente de uva MASQUELIER's OPCs sobre a saúde de agricultores expostos a pesticidas.

O participante deste estudo receberá cápsulas que podem conter o extrato de semente de uva ou placebo (cápsulas sem o extrato) para ser ingerido por 56 dias. Ao final do estudo, o participante terá acesso gratuito e por tempo indeterminado, aos melhores métodos diagnósticos e terapêuticos que se demonstrarem eficazes.

MASQUELIER's® Original OPCs tem sido utilizado como um suplemento dietético vegetal desde os anos 1990 em vários países da Europa. Foram feitos testes e os resultados mostraram que o composto é seguro e livre de efeitos adversos. As cápsulas de placebo (sem o composto) também são seguras e contêm apenas os ingredientes veículos: celulose microcristalina e estearato de magnésio.

Serão coletados 28 ml de sangue (7 tubos de coleta de sangue) em 2 momentos da pesquisa, antes do tratamento com o produto e depois do tratamento, para avaliação de seu estado geral de saúde, possíveis efeitos dos agrotóxicos sobre esses exames e possíveis efeitos do extrato de semente de uva. A coleta será feita por profissional qualificado, utilizando material descartável, seguindo os procedimentos de assepsia adequados, garantindo assim a sua integridade física. Após a coleta será oferecido alimento aos participantes. Também será aplicado um

questionário sobre seus hábitos, seu estado de saúde e seu histórico relacionado ao trabalho, que leva em média 15 minutos para ser respondido.

Todas as análises serão realizadas, de modo a não representar nenhum custo financeiro, para você. Você terá acesso aos resultados e possíveis atendimentos que se fizerem necessários.

IV – ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO PARTICIPANTE DA PESQUISA

Você tem assegurado o direito de a qualquer momento do estudo solicitar informações esclarecedoras sobre o andamento da pesquisa, bem como dos eventuais riscos e benefícios relacionados à sua participação neste estudo, através dos telefones (48) 37218131/988173072 ou na Unidade de Análises Clínicas do Hospital Universitário (HU) da UFSC (pesquisador), 37219206 ou na Rua Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401, Trindade, Florianópolis/SC (Comitê de Ética em Pesquisa: grupo de pessoas responsável pela defesa dos interesses dos participantes da pesquisa). E-mail: s.maluf@ufsc.br.

Riscos e desconforto: Pode ocorrer desconforto no momento da coleta. Fica assegurado que no caso de eventual problema na coleta ou qualquer outro dano, como efeitos adversos ou indesejáveis da utilização do produto em investigação ou qualquer outro problema de saúde decorrentes da pesquisa, o Sr(a). receberá assistência imediata integral e tratamento adequado pela equipe de saúde do HU UFSC e será cuidado pelo tempo que for necessário até que sua condição de saúde se restabeleça (não são esperados problemas deste tipo pois os profissionais farão a coleta com o máximo de cautela, no entanto é importante garantir assistência no caso de qualquer problema relacionado ao projeto). O participante terá ajuda no preenchimento do questionário e liberdade de interromper o preenchimento, caso ocorra cansaço para responder ou constrangimento ao responder algumas das questões.

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 da pesquisa serão publicados sem revelar sua identidade, entretanto estarão disponíveis para consulta pela equipe envolvida no projeto, e pelo Comitê de Ética. Qualquer prejuízo financeiro ocorrido devido a este estudo ou quebra involuntária de sigilo será ressarcido ou indenizado pelos pesquisadores responsáveis pela pesquisa.

As análises a serem feitas com a amostra de sangue são: (1) estresse oxidativo, dano de DNA e microRNAs (para saber o risco de câncer); (2) MPO, TNF- α , IL-1 β e IL-6 e imunofenotipagem (para saber sobre sua imunidade). Os resultados dos exames e avaliações, depois de realizados serão informados ao Sr.(a) se e quando o Sr.(a) quiser.

A legislação brasileira não permite que você tenha qualquer compensação financeira pela sua participação em pesquisa e você não terá nenhuma despesa advinda da sua participação na pesquisa. Caso alguma despesa extraordinária associada à pesquisa venha a ocorrer (com transporte, alimentação e outros), você e seu acompanhante serão integralmente ressarcidos pelos pesquisadores responsáveis pela pesquisa. Caso você tenha algum dano material ou imaterial em decorrência da pesquisa poderá solicitar indenização, de acordo com a legislação vigente.

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 (o participante pode retirar seu consentimento 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 via deste termo, elaborado em duas vias, assinadas pelos pesquisadores.

Data: _____

Assinatura do participante

Pesquisador Principal

Obs. Todas as páginas deste documento deverão ser rubricadas pelo pesquisador responsável ou pessoa por ele delegada e pelo participante da pesquisa.

ANEXO B – QUESTIONÁRIO

AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL A AGROTÓXICOS

1. Questionário número: ___

2. Data: __ / __ / __

3. Localidade:
DADOS SÓCIO-DEMOGRÁFICOS – PARTE I
4. Nome do entrevistado:
5. Data de nascimento: __/__/__
6. Idade: __ anos completos
7. Local de nascimento: cidade _____ estado __ __
EXPOSIÇÃO A AGENTES QUÍMICOS (Assinale quando SIM)
8. O que você planta? _____
9. Quanto você produz anualmente? _____
10. Qual o período da(s) safra(s)? _____
11. Quando você faz a aplicação de agrotóxicos durante a safra? _____
12. Quantas horas duram as aplicações? _____
13. Em qual turno você normalmente aplica? () matutino () vespertino
14. Quais agrotóxicos você utiliza atualmente? _____ _____
15. Você se lembra qual agrotóxicos você mais usava a 20 anos atrás? _____
16. Como você compra os agrotóxicos? () Com receita () Sem receita
17. Você lê as bulas antes de utilizar o produto? () Sim () Não
18. Quantas vezes por semana você utiliza () Uma () Pelo menos duas () 3 ou mais
19. O que você faz com o agrotóxico? () Prepara a calda () aplica o produto
20. Como você faz a aplicação? () Pulverizador costal () Máquina
21. Quando foi a sua última exposição? _____ horas ou _____ dias
22. Qual(is) foi(RAM) o agrotóxico(s) utilizado(s)? _____
23. Você utiliza algum EPI? () Sim () Não
24. Qual EPI você utiliza? () Máscaras () Luvas () Botas () Roupas de manga comprida
25. 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
26. Ao aplicar os agrotóxicos molha a roupa: () Todos os dias () Às vezes
HISTÓRIA OCUPACIONAL (escrever no verso se necessário)
27. Quantos anos você tinha quando começou a trabalhar? _____ anos
28. Que trabalhos executou desde então? Por quanto tempo? FUNÇÃO/ATIVIDADE EMPRESA OU LOCALIDADE, MUNICÍPIO PERÍODO a. _____ b. _____ c. _____ d. _____
Conferir se o tempo de trabalho referido nas perguntas acima corresponde ao tempo de trabalho de toda história Ocupacional. Se não, completar.
HISTÓRIA CLÍNICA
29. Quantas intoxicações por agrotóxicos você já teve ao longo da vida? _____

30. Queixa atual:
31. História Pgressa da moléstia atual: (início, duração, característica do sintoma no início, evolução, relação com outras queixas, situação atual).
32. Você tem filhos? () sim () não
33. Você teve alguma complicação na gravidez? ()sim () não Qual? _____
34. Já teve algum aborto espontâneo? ()sim () não Quantos?
EXAME FÍSICO
35. Estado Geral: ()bom ()regular ()ruim
36 Peso: _____ altura: _____
36. Frequência Respiratória:
37. Pressão Arterial:
38. Pulso:
INTERROGATÓRIO SOBRE DIFERENTES PATOLOGIAS
DIABETES
Você tem diabetes () sim () Não Há quanto tempo? _____ anos Alguém da sua família tem diabetes () sim () Não 50. Quem: _____ Há quanto tempo? _____ anos
HIPOTIREODISMO
Você tem hipotireoidismo () sim () Não Há quanto tempo? _____ anos Alguém da sua família tem hipotireodismo () sim () Não Quem: _____ Há quanto tempo? _____ anos
AUDIÇÃO
Você tem algum problema de audição? () sim () Não Há quanto tempo? _____ anos Alguém da sua família tem ou teve () sim () Não Quem: _____ Há quanto tempo? _____ anos

Você apresenta alguma dificuldade para entender a fala quando há várias pessoas falando ao mesmo tempo, ou quando há ruído competitivo?

() sim () Não Há quanto tempo? ____anos

Alguém da sua família tem ou teve () sim () Não

Quem: _____ Há quanto tempo? ____anos

Você tem zumbido? () sim () Não Há quanto tempo? ____anos

Alguém da sua família tem ou teve () sim () Não

Quem: _____ Há quanto tempo? ____anos

Você tem tontura? () sim () Não Há quanto tempo? ____anos

Alguém da sua família tem ou teve () sim () Não

Quem: _____ Há quanto tempo? ____anos

As pessoas da sua família reclamam que você não escuta bem?

() sim () Não Há quanto tempo? ____anos

Alguém da sua família tem ou teve () sim () Não

Quem: _____ Há quanto tempo? ____anos

Você tem ou teve exposto ao ruído?

() sim () Não Por quanto tempo? ____anos

Há quanto tempo? ____anos

EPILEPSIA

Você tem ou teve crises (ataques, acesso, convulsão) na qual perde a consciência e cai subitamente? () sim () Não Há quanto tempo? ____anos

Alguém da sua família tem ou teve () sim () Não

Quem: _____ Há quanto tempo? ____anos

Você tem ou teve crises em que perde o contato com a realidade (meio) e fica como se estivesse fora do ar? () sim () Não Há quanto tempo? ____anos

Alguém da sua família tem ou teve () sim () Não

Quem: _____ Há quanto tempo? ____anos

Você tem ou teve crises na qual tem repuxões incontroláveis em braços, pernas, na boca ou vira a cabeça para o lado?

() sim () Não Há quanto tempo? ____anos

Alguém da sua família tem ou teve () sim () Não

Quem: _____ Há quanto tempo? ____anos

Você tem ou teve crises de desmaio e que ao acordar nota que fez xixi ou cocô na roupa sem perceber? () sim () Não Há quanto tempo?_____anos

Alguém da sua família tem ou teve () sim () Não

Quem: _____ Há quanto tempo?_____anos

Você tem ou teve crises na qual sente sensação ruim de “fundeza” ou bola na “boca do estômago” e que sobe até a garganta e em seguida sai fora do ar, e depois dizem que você ficou mexendo em algo com as mãos ou mastigando ou olhando para algo distante? () sim () Não Há quanto tempo?_____anos

Alguém da sua família tem ou teve () sim () Não

Quem: _____ Há quanto tempo?_____anos

Algum médico ou profissional de saúde ou mesmo familiares já lhe disse que você tem ou teve convulsão febril na infância; ou durante alguma doença grave qualquer? () sim () Não Há quanto tempo?_____anos

Alguém da sua família tem ou teve () sim () Não

Quem: _____ Há quanto tempo?_____anos

Você tem rápidos abalos tipo “choque” nos braços (as coisas caem da mão) ou pernas com ou sem queda, principalmente pela manhã?

() sim () Não Há quanto tempo?_____anos

Alguém da sua família tem ou teve () sim () Não

Quem: _____ Há quanto tempo?_____anos

Há alguém desta casa com epilepsia?

() sim () Não Há quanto tempo?_____anos

Alguém da sua família tem ou teve () sim () Não

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.

39. Quando você se sente tenso ou contraído

3 () A maior parte do tempo

2 () Boa parte do tempo

1 () De vez em quando

0 () Nunca

40. 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
41. **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
42. **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
43. **Você está com a cabeça cheia de preocupações?**
 3 () A maior parte de tempo
 2 () Boa parte do tempo
 1 () De vez em quando
 0 () Raramente
44. **Você se sente alegre?**
 3 () Nunca
 2 () Poucas vezes
 1 () Muitas vezes
 0 () A maior parte do tempo
45. **Você consegue ficar sentado à vontade e se sentir relaxado?**
 0 () Sim, quase sempre
 1 () Muitas vezes
 2 () Poucas vezes
 3 () Nunca
46. **Você sente que está lento para pensar e fazer as coisas?**
 3 () Quase sempre
 2 () Muitas vezes
 1 () De vez em quando
 0 () Nunca
47. **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
48. **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
49. **Você se sente inquieto, como se não pudesse ficar parado em lugar nenhum?**
 3 () Sim, demais
 2 () Bastante
 1 () Um pouco
 0 () Não me sinto assim
50. **Você fica esperando animado 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
51. **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
52. **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		
CONSUMO DE TABACO		
109. Você já fumou?: ()sim, ainda fuma ()não/nunca () sim, mas parou há __anos		
110. Há quantos anos você fuma ou durante quantos anos você fumou? Há __ anos OU há __ __ meses OU durante __ __ anos		
111. O que você fuma ou fumou MAIS? ()cigarro comercial ()cigarro de palha ()charuto ()cachimbo ()outro:_____		
112. Quantos CIGARROS em média você fuma ou fumava por dia ou por semana? cigarros/dia OU cigarros/semana		
113. Se já parou de fumar, por que você parou? _____		
CONSUMO DE BEBIDA ALCOÓLICA		
114. Qual bebida você mais gosta de beber? _____		
115. Com que idade você começou a beber? __ anos		
116. Qual bebida você costuma(va) beber mais freqüentemente? ()cerveja () cachaça () outra:_____		
117. Quantas doses você costuma(va) beber por semana? Um drinque ou uma dose é: uma cerveja longneck ou latinha; meia cerveja grande (600 ml) ou chopp (350 mL); uma dose de pinga, uísque ou outro destilado (50ml) ou uma taça de vinho (150ml). Cerveja ou chopp: __ __ Cachaça ou uísque __ __ Vinho: __ __ Anotar freqüência por mês, se for necessário: _____		
118. Se parou de beber, por que você parou? _____		
CONSUMO DE ALIMENTOS E ÁGUA		
119. Você se alimenta de: () Carnes e verduras () Não come carne () Mais de uma porção de carne vermelha todos os dias		
120. Qual a sua fonte de alimentos (carnes e verduras) () Produção própria () compra dos vizinhos () supermercado		
121. Qual a sua fonte de água? () Córrego próximo a casa () Fonte de água natural () Água encanada () Poço artesiano		

122. Onde são descartados os resíduos de seu banheiro?
 Há saneamento básico Diretamente no córrego

123. Você toma chimarrão?
 Todos os dias Algumas vezes por semana

MEDICAMENTOS

124. Você costuma tomar algum remédio por conta própria? Sim
 Não

125. Quais? _____

126. Com que frequência? Diariamente Semanalmente De vez em quando

127. Você toma algum medicamento prescrito pelo seu médico? Sim
 Não

128. Quais? _____

129. Com que frequência? Diariamente Semanalmente
 De vez em quando

DADOS SÓCIO-DEMOGRÁFICOS – PARTE II

130. Cor: Branca Negra Pardo Outra: _____

131. Estado civil atual: solteiro casado com companheira viúvo separado/divorciado/desquitado

132. Até que ano (série) você estudou na escola? Completei o (a) ____ano (série) do _____ na escola.

133. Qual sua religião? sem religião Católica protestante/crente/evangélico espírita outra _____

134. Quais e quantos deste itens você possui em sua casa?

	Não tem	Tem			
Televisão em cores					
Video cassete ou DVD					
Rádio					
Banheiro					
Automóvel					
Máquina de lavar					
Geladeira					
Freezer (independente ou parte da geladeira duplex)					
Trator					

ANEXO C – COMITÊ DE ÉTICA

PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Ensaio clínico randomizado duplo-cego para avaliação dos benefícios de MASQUELIER's OPCs em uma população de agricultores exposta a pesticidas no Brasil

Pesquisador: Sharbel Weidner Maluf

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.); Pesquisas com coordenação e/ou patrocínio originados fora do Brasil, excetuadas aquelas com patrocínio do Governo Brasileiro; **Versão:** 4 **CAAE:** 89584618.0.0000.0121

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

Patrocinador Principal: International Nutrition Company (INC Agency B.V.)

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.127.656

HIPÓTESE

Os agricultores expostos a agrotóxicos terão um melhor estado de saúde, medido através de marcadores laboratoriais, após a administração do extrato de semente de uva.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um estudo unicêntrico que tem por objetivo avaliar os efeitos da administração do extrato de semente de uva MASQUELIER's OPCs em marcadores imunológicos, de dano de DNA, estresse oxidativo e expressão de miRNAs em uma população de agricultores altamente exposta a pesticidas. A amostra será composta por 80 agricultores expostos a agrotóxicos, do município de Santo Amaro da Imperatriz, que serão avaliados em relação a marcadores genéticos, imunológicos, toxicológicos e bioquímicos em dois momentos: antes e 2 meses depois da administração do extrato da semente de uva MASQUELIER's OPCs ou placebo. Os pesquisadores propõem um estudo mais completo, para testar um composto antioxidante usado em países europeus, visando a prevenção de doenças, como o câncer e a melhora na qualidade de vida desses trabalhadores.

Patrocinador: International Nutrition Company (INC Agency B.V.)

Número de participantes incluídos no Brasil: 80

Previsão de início do estudo: Novembro/2018 Previsão de encerramento do estudo: Março/2019

Considerações Finais a critério da CONEP:

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - Conep, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS nº 466 de 2012 e na Norma Operacional nº 001 de 2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: Protocolo aprovado.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1111939.pdf	21/12/2018 15:00:39		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	21/12/2018 14:58:19	Sharbel Weidner Mahuf	Aceito
Outros	Carta_Resposta_CONEP.docx	21/12/2018 14:58:00	Sharbel Weidner Mahuf	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Extrato_Semente_de_Uva.docx	21/12/2018 14:46:06	Sharbel Weidner Mahuf	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto_com_patrocinador.pdf	21/12/2018 11:46:45	Sharbel Weidner Mahuf	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Aceite_Secretaria_de_Saude.pdf	03/08/2018 13:44:33	Sharbel Weidner Mahuf	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	DeclaracaoHU.pdf	26/04/2018 08:49:51	Sharbel Weidner Mahuf	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado.