



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

VICTOR NOGUEIRA DA GAMA KOHLS

**POLIMORFISMO DE CYP2C9: ESTUDO DA RELAÇÃO DO USO DE
AGROTÓXICOS COM O DESENVOLVIMENTO DE DOENÇAS EM
AGRICULTORES DO ESPÍRITO SANTO**

VITÓRIA, ES
2020

VICTOR NOGUEIRA DA GAMA KOHLS

**POLIMORFISMO DE CYP2C9: ESTUDO DA RELAÇÃO DO USO DE
AGROTÓXICOS COM O DESENVOLVIMENTO DE DOENÇAS EM
AGRICULTORES DO ESPÍRITO SANTO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof^o. Dr^o. Iúri Drumond Louro

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Débora Dummer Meira

VITÓRIA, ES
2020

VICTOR NOGUEIRA DA GAMA KOHLS

**POLIMORFISMO DE CYP2C9: ESTUDO DA RELAÇÃO DO USO DE
AGROTÓXICOS COM O DESENVOLVIMENTO DE DOENÇAS EM
AGRICULTORES DO ESPÍRITO SANTO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Apresentada em 18 de fevereiro de 2020.

Prof. Dr. Iúri Drumond Louro
Universidade Federal do Espírito Santo - UFES
Orientador

Profa. Dra. Débora Dummer Meira
Universidade Federal do Espírito Santo - UFES
Co-orientadora

Profa. Dra. Adriana Madeira Álvares da Silva
Universidade Federal do Espírito Santo - UFES

Prof. Dra. Jamila Alessandra Perini Machado
Universidade da Zona Oeste - UEZO

VITÓRIA, ES
2020

Dedico este trabalho com imenso respeito:

*Aos lavradores da região do Caparaó-ES
que, ao permitirem que mensurássemos suas dores,
nos impulsionaram no sentido de amenizá-las e um dia, extinguí-las.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e meus amigos: minhas raízes profundas.

Ao meu orientador Prof. Dr. Lúri Drumond Louro que, com sua coordenação e apoio, tornou possível este projeto junto à equipe do NGHМ. A todos, muito obrigado!

À minha co-orientadora Prof^a. Dr^a. Débora Dummer Meira, pela perfeita condução desta orientação, generosidade em compartilhar o rigor de seus saberes e também pela ternura. Sem ela, este trabalho não seria possível.

À professora da Universidade Estadual da Zona Oeste-RJ (UEZO), Dr^a. Jamila Alessandra Perini Machado e toda a sua equipe, que me permitiram experimentar que ciência se faz em cooperação. Obrigado, doutora.

À Prof^a. Dr^a. Adriana Madeira Alvares da Silva que gentilmente nos propiciou não apenas o acesso a importante material biológico como também o apoio de sua equipe (obrigado Joaquim e obrigado Professor Wagner!).

À Dra. Raquel Reis (NGHM), pela revisão deste trabalho. Obrigado, doutora.

À professora do Massachusetts Institute of Technology (MIT), Dr^a. Stephanie Seneff, que nos honrou demonstrando sincero interesse em nosso trabalho. Muita gentileza. Emocionante. *Thank you doctor!*

À CAPES por apoiar este projeto.

À UFES (Universidade Federal do Espírito Santo) por confiar a mim a oportunidade de realizar este mestrado.

RESUMO

KOHLIS, V.N.G. **Polimorfismo de CYP2C9: estudo da relação do uso de agrotóxicos com o desenvolvimento de doenças em agricultores do Espírito Santo**. 2020. 141f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia– Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, UFES, Espírito Santo. Brasil.

O Brasil é o líder do ranking mundial em consumo de agrotóxicos. O uso indiscriminado de agrotóxicos associado à falta de informação técnica sobre o uso do mesmo e dos equipamentos de proteção individual (EPI), podem colocar em risco a saúde tanto do agricultor como das pessoas que não estão em contato direto com a lavoura, como familiares e até mesmo consumidor final do produto agrícola. A superfamília Citocromo P450 (CYP) tem sido o foco da maioria das pesquisas farmacogenéticas recentes e, nesse contexto, o gene *CYP2C9* se destaca por codificar a enzima CYP2C9, extremamente importante para a metabolização de diversas substâncias endógenas e xenobióticos específicos. Dentre os principais xenobióticos sob investigação na atualidade estão os agrotóxicos (e potenciais causadores de doenças em humanos). Seu uso indiscriminado associado à falta de informação técnica acerca do manuseio seguro e da utilização dos equipamentos de proteção individual (EPI) pode colocar em risco a saúde do agricultor. Com base nesta hipótese, delimitou-se como objetivo geral deste trabalho verificar o risco do uso dos agrotóxicos para o desenvolvimento de doenças e sua correlação com dois importantes polimorfismos de *CYP2C9* em lavradores residentes na região Sul do estado do Espírito Santo, Brasil. Para este fim, determinou-se a frequência alélica de *CYP2C9**1 (alelo selvagem), *CYP2C9**2 (rs1799853) e *CYP2C9**3 (rs1057910) em 304 amostras de sangue periférico de indivíduos expostos ou não expostos aos agrotóxicos por meio da técnica de PCR em tempo real. Os dados de frequência alélica obtidos nesta pesquisa foram semelhantes aos de outros três estudos brasileiros, tendo os alelos *1 e *3 figurado como os de maior e menor ocorrência, respectivamente. Os diferentes genótipos de *CYP2C9* foram divididos em classes de acordo com a capacidade de metabolização da referida enzima: normal ou “A” (*1/*1), intermediária ou “B” (*1/*2, *1/*3) e lenta ou “C” (*2/*2, *2/*3 e *3/*3). Foram encontradas associações significativas entre os genótipos de *CYP2C9* e o surgimento de doenças/sintomas somente em agricultores que utilizaram agrotóxicos. Surpreendentemente, os resultados obtidos demonstraram que os metabolizadores normais são mais suscetíveis ao desenvolvimento de alguma doença/sintoma em relação aos indivíduos metabolizadores “B” e “C”. Ainda nos metabolizadores “A”, notou-se uma correlação com alterações na pressão arterial, doenças cardiovasculares e doenças renais, ao passo que para os metabolizadores intermediários foi observada uma associação com o surgimento de déficit de atenção e abortamentos. Nenhum resultado estatisticamente significativo foi verificado para os metabolizadores lentos. Nossos resultados indicam que os agricultores do sul do estado do Espírito Santo que utilizaram agrotóxicos desenvolveram/apresentaram alterações na pressão arterial, doenças cardiovasculares e renais, além de aborto e déficit de atenção, de maneira dependente e correlacionada ao genótipo de *CYP2C9* que possuem.

Palavras-chave: *CYP2C9*. Agricultores. Agrotóxicos. Glifosato. Doenças cardiovasculares.

ABSTRACT

KOHL, V.N.G. **Polymorphism of *CYP2C9*: study of the relationship of the use of pesticides with the development of diseases in farmers in Espírito Santo**. 2020. 144 pages. Dissertation (Master in Biotechnology) - Postgraduation Biotechnological Programme, UFES, Espírito Santo. Brazil.

Brazil is the leader of the world ranking in consumption of pesticides. The indiscriminate use of pesticides associated with the lack of technical information on the use of the same and of personal protective equipment (PPE), can put the health of both the farmer and people who are not in direct contact with the crop, such as family members, at risk and even final consumer of the agricultural product. The Cytochrome P450 (CYP) superfamily has been the focus of most recent pharmacogenetic research and, in this context, the *CYP2C9* gene stands out for encoding the *CYP2C9* enzyme, extremely important for the metabolism of several endogenous substances and specific xenobiotics. Among the main xenobiotics under investigation today are the pesticides (and potential causers of diseases in humans). Its indiscriminate use associated with the lack of technical information about safety, handling, and the use of personal protective equipment (PPE) can put place the farmer's health at risk. Based on this hypothesis, the general objective of this work was to verify the risk of the use of pesticides for the development of diseases and its correlation with two important *CYP2C9* polymorphisms in farmers living in the southern region of the State of Espírito Santo, Brazil. For this purpose, the allele frequency of *CYP2C9* *1 (wild allele), *CYP2C9* *2 (rs1799853) and *CYP2C9* *3 (rs1057910) in 304 samples of peripheral blood from individuals exposed or not exposed to pesticides were determined by real-time PCR technique. The allele frequency data obtained in this research were similar to those of three other Brazilian studies, with the *1 and *3 alleles being the most and least occurring, respectively. The different *CYP2C9* genotypes were divided into classes according to the metabolism capacity of that enzyme: normal or "A" (*1/*1), intermediate or "B" (*1/*2, *1/*3) and slow or "C" (*2/*2, *2/*3 and *3/*3). Significant associations were found between *CYP2C9* genotypes and the appearance of diseases/symptoms only in farmers who used pesticides. Surprisingly, the results obtained demonstrated that normal metabolizers are more susceptible to the development of some diseases/symptom in relation to metabolic "B" and "C" individuals. Still in the "A" metabolizers, was noted a correlation with changes in blood pressure, cardiovascular diseases and kidney diseases, while for the intermediate metabolizers an association was observed with the appearance of attention deficit and abortions. No statistically significant results were found for slow metabolizers. Our results indicate that farmers in the southern State of Espírito Santo who used pesticides developed/presented changes in blood pressure, cardiovascular and kidney diseases, in addition to abortion and attention deficit, in a dependent and correlated manner to the *CYP2C9* genotype they have.

Keywords: *CYP2C9*. Farmers. Pesticides. Glyphosate. Cardiovascular diseases.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Localização das CYPs na célula.....	17
Figura 2 - Ciclo catalítico de CYP450.....	19
Figura 3 - Percentual de CYPs responsáveis pelo metabolismo de fase 1 dos 200 medicamentos mais prescritos nos EUA.....	21
Figura 4 - Conversão de glifosato em AMPA.....	35
Figura 5 - Gráfico de discriminação alélica (<i>allelic discrimination plot</i>) para análise de CYP2C9*2.....	42
Figura 6 - Gráfico de discriminação alélica (<i>allelic discrimination plot</i>) para análise de CYP2C9*3.....	43
Figura 7 - Frequência da quantidade de sintomas apresentados pelos agricultores.....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Frequências (%) alélicas para <i>CYP2C9</i> em diferentes populações.....	25
Tabela 2 - Frequência dos Genótipos da População Estudada.....	48
Tabela 3 - Frequência dos Alelos da População Estudada.....	49
Tabela 4 - Gênero dos trabalhadores rurais.....	50
Tabela 5 - Distribuição do tempo de ocupação (em anos) em relação à faixa etária na população de estudo.....	50
Tabela 6 - Distribuição do tempo de ocupação (em anos) em relação à faixa etária na população de estudo em percentual (%)	50
Tabela 7 - Quantidade de Sintomas Apresentados pelos Agricultores	51
Tabela 8 - Quantidade de trabalhadores rurais que utilizam agrotóxicos	51
Tabela 9 - Frequência de uso dos agrotóxicos	52
Tabela 10 - Média de Sintomas Apresentados pelos Agricultores.....	53
Tabela 11 - Uso Bebida alcoólica / Tabaco.....	54
Tabela 12 - Classe de genótipos / Presença de Sintomas.....	54
Tabela 13 - Uso de Agrotóxicos / Presença de Sintomas	55
Tabela 14 - Distribuição do número indivíduos por grupo de sintomas.....	56
Tabela 15 - Quantidade de sintomas / Uso de agrotóxicos.....	56
Tabela 16 - Análise para o sintoma “Irritação ocular”	57
Tabela 17 - Análise para o sintoma “Lesões na pele e alergias”	58
Tabela 18 - Análise para o sintoma “Queimaduras na pele”	59
Tabela 19 - Análise para o sintoma “Náusea e ânsia de vômito”	60
Tabela 20 - Análise para o sintoma “Catarro”	61
Tabela 21 - Análise para o sintoma “Dor abdominal”	62
Tabela 22 - Análise para o sintoma “Diarreia”	63

Tabela 23 - Análise para o sintoma “Digestão difícil”	64
Tabela 24 - Análise para o sintoma “Chiados/sibilos”	65
Tabela 25 - Análise para o sintoma “Asma”	66
Tabela 26 - Análise para o sintoma “Inflamações gástricas”	67
Tabela 27 - Análise para o sintoma “Doenças hepáticas”	68
Tabela 28 - Análise para o sintoma “Alterações na pressão arterial”	69
Tabela 29 - Análise para o sintoma “Infertilidade”	70
Tabela 30 - Análise para o sintoma “Lacrimejamento”	71
Tabela 31 - Análise para o sintoma “Tonturas”	72
Tabela 32 - Análise para o sintoma “Tosse”	73
Tabela 33 - Análise para o sintoma “Falta de ar”	74
Tabela 34 - Análise para o sintoma “Visão turva”	75
Tabela 35 - Análise para o sintoma “Tremores”	76
Tabela 36 - Análise para o sintoma “Vômitos”	77
Tabela 37 - Análise para o sintoma “Dor nas articulações”	78
Tabela 38 - Análise para o sintoma “Dor nas articulações”	79
Tabela 39 - Análise para o sintoma “Artrose/osteoporose”	80
Tabela 40 - Análise para o sintoma “Doenças renais”	81
Tabela 41 - Análise para o sintoma “Doenças respiratórias”	82
Tabela 42 - Análise para o sintoma “Déficit de atenção”	83
Tabela 43 - Análise para o sintoma “Abortamentos”	84
Tabela 44 - Análise para o sintoma “Dor de cabeça”	85
Tabela 45 - Análise para o sintoma “Suor excessivo”	86
Tabela 46 - Análise para o sintoma “Salivação”	87
Tabela 47 - Análise para o sintoma “Agitação/irritabilidade”	88

Tabela 48 - Análise para o sintoma “Formigamento”	89
Tabela 49 - Análise para o sintoma “Miose”	90
Tabela 50 - Análise para o sintoma “Câimbras”	91
Tabela 51 - Análise para o sintoma “Dor no corpo”	92
Tabela 52 - Análise para o sintoma “Depressão”	93
Tabela 53 - Análise para o sintoma “Doenças cardiovasculares”	94
Tabela 54 - Análise para o sintoma “Câncer”	95
Tabela 55 - Análise para o sintoma “Palpitação cardíaca”	96
Tabela 56 - Análise para o sintoma “Lesão em glândulas salivares”	97
Tabela 57 - Análise para o sintoma “Malformação”	98
Tabela 58 - Análise para o sintoma “Hiperatividade”	99
Tabela 59 - Síntese dos Resultados Significantes.....	100

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido Araquidônico
AchE	Enzima Acetilcolinesterase
ADR	Reação adversa a medicamento (<i>adverse drug reaction</i>)
AW1	Tampão de Limpeza 1
AW2	Tampão de Limpeza 2
AE	Tampão de Eluição
AMPA	Ácido Aminometilfosfônico
Ca	Cálcio
CNVs	Variações no número de cópias (<i>copy number variations</i>)
COOH	Ácido carboxílico
CYP	Citocromo P450
CYP2C19	Citocromo P450, família 2, subfamília C, polipeptídeo 19
CYP2C9	Citocromo P450, família 2, subfamília C, polipeptídeo 9
CYP2D6	Citocromo P450, família 2, subfamília D, polipeptídeo 6
DHA	Docosahexaenóico
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EFSA	Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar
Ehs	Epóxido-hidrolases
EM	Metabolizador extensivo ou normal (<i>extensive metabolizer</i>)
EPI	Equipamentos de proteção individual
EPA	Ácidos Linoléico Eicosapentaenóico
EPSPS	5- Nolpiruvilshikimato-3-Fosfato Sintase
FAO	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura
FMOs	Flavina mooxigenases
FMN	Mononucleotídeo de Flavina
GM	Geneticamente modificadas
GST	Glutathiona-S-transferase
HBG	Herbicidas a base de glifosato
IM	Metabolizador intermediário (<i>intermediate metabolizer</i>)
Kb	Quilobase
LD50	Dose Letal Mediana
LMR	Limites Máximos de Resíduos

MN	Manganês
MR	Índice metabólico (<i>metabolic ratio</i>)
MT	Metiltransferases
NNG	N-nitrosoglifosato
Na	Sódio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NAT	N-acetiltransferase
NH ₂	Grupo Amina
NTS	Núcleo de Trato Solitário
OH	Hidroxila
PARA	Programa de Análise de Resíduos de Alimentos
Pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PEP	Fosfoenolpiruvato
PM	Metabolizador lento (<i>poor metabolizer</i>)
POP	Poluentes Orgânicos Persistentes
PPIs	Inibidores de bomba de próton (<i>proton pump inhibitors</i>)
PTDRS	Plano Territorial de Desenvolvimento Rural Sustentável
PTR	Parecer Técnico de Reavaliação
PUFA	Ácidos Graxos Poliinsaturados
RE	Retículo endoplasmático
RH	Substrato orgânico
SH	Tiol
SNP	Polimorfismos de base única (<i>single nucleotide polymorphisms</i>)
SOD	Superóxido dismutase
SSRIs	Inibidores seletivos de recaptação de serotonina (<i>selective serotonin re-uptake inhibitors</i>)
STAR*D	<i>Sequenced Treatment Alternatives to Relieve Depression</i>
SULT	Sulfotransferase
TCA	Antidepressivos tricíclicos (<i>tricyclics antidepressants</i>)
UGT	UDP-glucuronil transferase
UM	Metabolizador ultra-rápido (<i>ultrarapid metabolizer</i>)
VKORC1	Gene Produtor da Enzima Vitamina K Epóxido Redutase
	xN Amplificação do gene CYP2D6

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 SISTEMA CITOCROMO P450	17
2.2 GENE <i>CYP2C9</i>	22
2.3 GLIFOSATO E <i>CYP2C9</i>	25
2.4 USO DE AGROTÓXICOS	27
2.5 DOENÇAS CAUSADAS POR AGROTÓXICOS	30
3 JUSTIFICATIVA	37
4 OBJETIVOS	38
4.1 OBJETIVO GERAL.....	38
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	38
5 MATERIAL E MÉTODOS	39
5.1 PERCURSO METODOLÓGICO	39
5.2 POPULAÇÃO DE ESTUDO	40
5.3 EXTRAÇÃO DE DNA.....	41
5.4 PCR EM TEMPO REAL PARA AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMOS DE <i>CYP2C9</i>	42
5.5 METODOLOGIA DE ANÁLISE DE DADOS	44
6 RESULTADOS	46
7 DISCUSSÃO	99
8 CONCLUSÃO	119
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	120
ANEXOS	134
ANEXO I - QUESTIONÁRIO	134
ANEXO II - PROTOCOLO DE SEGURANÇA NA MANIPULAÇÃO DE AGROTÓXICOS	137

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o líder do ranking mundial em consumo de agrotóxicos. Este uso excessivo está diretamente relacionado à atual política agrícola do país que visa alavancar a produtividade no meio rural, no mercado internacional, de forma a aumentar a disputa com outros grandes produtores (JOBIM *et al.*, 2010). Desta forma, a venda de agrotóxicos vem crescendo em grande escala nos últimos anos, passando de US\$ 2 bilhões em 2001 e alcançando valores de US\$ 9,56 bilhões em 2016. Segundo o Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal, no ano de 2016 mais de 460.000 toneladas de venenos foram jogadas nas lavouras (IBAMA 2017; INCA, 2018).

Indiferente aos grandes movimentos de conscientização sobre a toxicidade dos pesticidas, o Brasil segue como o maior consumidor de produtos agrotóxicos no mundo, alcançando níveis alarmantes quanto ao prejuízo ambiental em decorrência da contaminação dos solos e da água (INCA, 2018).

Segundo estudo de Bombardi (2017), foram notificados ao Ministério da Saúde 25.106 mil casos de intoxicações por agrotóxicos de uso agrícola. Entre 2007 e 2014, uma média de 3.125 casos por ano e de 8 intoxicações por dia. Destas intoxicações, 1.066 casos foram registrados no estado do Espírito Santo (ES). Foi observado ainda, 1.186 mortes no país entre 2007 e 2014 decorrentes do uso de agrotóxicos, o que gera uma média de 148 mortes por ano. Considerando os casos de tentativa de suicídios usando agrotóxicos, tem-se um valor de 9.584 casos no país, entre 2007 e 2014.

O uso indiscriminado de agrotóxicos associado à falta de informação técnica sobre o uso do mesmo e dos equipamentos de proteção individual (EPI), podem colocar em risco a saúde tanto do agricultor como das pessoas que não estão em contato direto com a lavoura, como familiares e até mesmo consumidor final do produto agrícola (PIGNATI *et al.*, 2017).

Estudo realizado pelo Plano Territorial de Desenvolvimento Rural Sustentável (PTDRS) em 2009 apontou que o principal problema do trabalhador rural no Território do Caparaó - ES é a saúde, pelo fato do uso indiscriminado e inadequado de agrotóxicos na monocultura de café, pela insalubridade do local de trabalho, gerando assim uma elevada contaminação dos alimentos e da água de consumo, colocando em risco a saúde desse trabalhador (PTDRS, 2017).

Em relação aos agricultores, estes são expostos de diversas formas aos agrotóxicos, tanto pela manipulação direta (preparo das “caldas”, aplicação dos produtos) quanto através de armazenamento inadequado, do reaproveitamento das embalagens, da contaminação da água e do contato com roupas contaminadas (INCA, 2010). Nesse sentido, estudos indicam que os trabalhadores rurais possuem um risco significativamente maior de desenvolver doenças. (MIRANDA-FILHO, 2012).

A exposição aos agrotóxicos pode ocorrer pelas vias digestiva, respiratória, dérmica ou por contato ocular (THUNDIYIL *et al.*, 2008), podendo determinar quadros de intoxicação aguda, subaguda e crônica, fato que potencializa a continuidade da prática como um problema de saúde.

Os mecanismos pelos quais o agrotóxico desencadeia suas reações são diversificados e dependentes da classe química em questão. Recentemente uma das alterações descrita na literatura como relacionada à exposição aos agrotóxicos é a epigenética, importante na modulação da expressão dos genes e com potencial transmissão para as futuras gerações. Trata-se principalmente da metilação diferencial nas ilhas CPGs presentes nas regiões promotoras dos genes e alterações do empacotamento do DNA pela acetilação das histonas e metilação das caudas de lisina das histonas (PLAAT *et al.*, 2018; ROTHSTEIN *et al.*, 2017).

O primeiro relato da associação de agrotóxicos com o surgimento de câncer foi apresentado há cerca de 50 anos com relação à maior prevalência de câncer de pulmão e pele nos agricultores que usam inseticidas em campos de uva (JUNGMANN, 1966; ROTH, 1958; THIERS *et al.*, 1967). Desde então, diversos estudos são realizados com o intuito de melhor compreender a relação dos agrotóxicos com a incidência de diferentes tipos de tumores (BRASIL *et al.*, 2018).

Muitos dos agrotóxicos utilizados na agricultura como organofosforados, carbamatos, malationa, diazinona e mais recentemente o glifosato, já foram classificados como prováveis carcinogênicos para humanos pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (GUYTON, 2015). Entre eles se destacam a malationa, diazinona e principalmente o glifosato, que são autorizados e amplamente usados no Brasil até como inseticidas em campanhas de saúde pública para o controle de vetores, além do uso na agricultura (VAN MAELE-FABRY *et al.*, 2011; INCA, 2018).

Estudos epidemiológicos e de saúde dos trabalhadores da zona rural vem mostrando que a alta exposição aos agrotóxicos está relacionada a diferentes tipos

de neoplasia, como câncer de mama, câncer de próstata, câncer de pulmão, câncer cerebral, câncer colorretal, câncer testicular, câncer de pâncreas, câncer esofágico, câncer de estômago, câncer de pele e linfoma não-Hodgkin (ALAVANJA AND BONNER, 2012; JAGA E DHARMANI, 2005; WEICHENTHAL *et al.*, 2010).

Diante deste contexto, o projeto pretende verificar principalmente qual é o papel (se existe associação do uso de agrotóxicos com o desenvolvimento de doenças/sintomas) dos agrotóxicos no desenvolvimento de doenças/sintomas em agricultores do Sul do Espírito Santo devido ao uso diário dos mesmos em seu ambiente de trabalho, e avaliar se existe associação da presença ou surgimento (ou agravamento) de doenças com os polimorfismos no gene *CYP2C9*, que é que codifica a enzima CYP2C9 (membro da família de proteínas Citocromo P450), extremamente importante para a metabolização de xenobióticos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 SISTEMA CITOCROMO P450

Citocromo P450 pertence a um grupo de enzimas conhecidas como monooxigenases, às quais incorporam um átomo de oxigênio em substratos orgânicos (MARTINUS *et al.*, 2000). As enzimas do citocromo P450 (CYPs), integram uma superfamília de enzimas do tipo heme. Elas são encontradas nos cinco reinos biológicos, possivelmente, indicando que as P450s podem ter evoluído a partir de um ancestral comum (ITO *et al.*, 2008).

A superfamília das CYPs tem sido o foco da maioria das pesquisas farmacogenéticas da atualidade. Isso é devido ao fato delas representarem as mais importantes enzimas de fase 1 e por serem responsáveis pelo metabolismo de substâncias endógenas e xenobióticos, incluindo mais de 60% de todas as medicações geralmente utilizadas (ZHOU *et al.*, 2008).

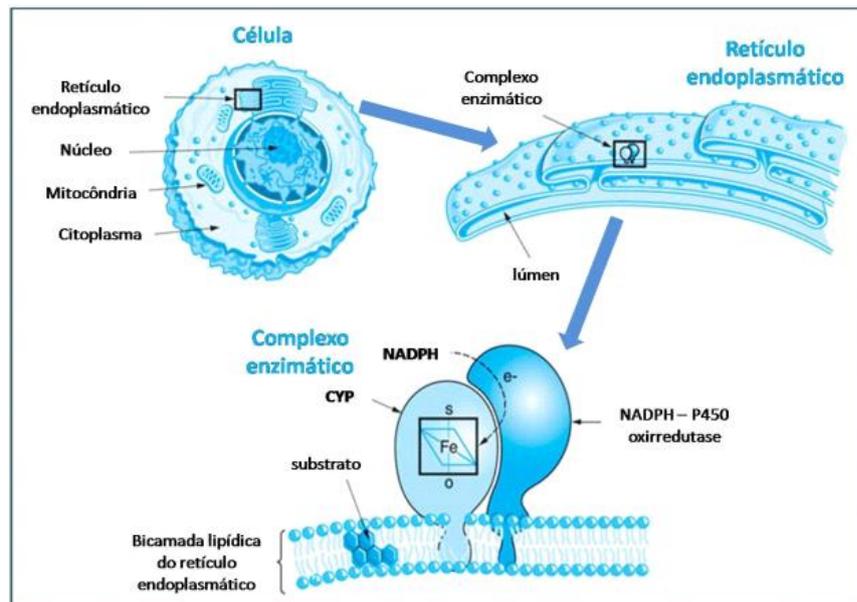


Figura 1: Localização das CYPs na célula (Adaptado de Brunton; Parker, 2008).

A Figura 1 descreve estrutura e local das CYPs que estão encaixadas na bicamada lipídica do retículo endoplasmático (RE). A maioria das enzimas está localizada na superfície citoplasmática do RE. Uma segunda enzima, a NADPH-citocromo P450 oxirredutase, transfere elétrons para a CYP que oxida substratos xenobióticos, na presença do oxigênio, muitos dos quais são hidrofóbicos e solubilizados no RE. Uma

única espécie de NADPHCYP oxirredutase transfere elétrons para todas as isoformas CYPs no RE (Brunton; Parker, 2008).

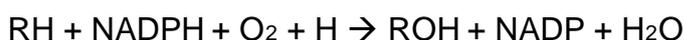
Essas enzimas diferem umas das outras na sua sequência de aminoácidos, na regulação por inibidores e agentes indutores e na especificidade das reações que catalisam. As enzimas P450 possuem propriedades espectrais singulares e, quando reduzidas e ligadas ao monóxido de carbono apresentam um composto rosado (daí o “P” de *pink*, rosa), com absorção de luz máxima no comprimento de onda 450 nanômetros (HANG *et al.*, 2003).

A nomenclatura para as isoenzimas do CYP450 é baseada no agrupamento das enzimas e genes em famílias e subfamílias com o prefixo CYP designando citocromo P450 (*mammalian cytochrome P450*). As famílias são identificadas por um número arábico (exemplo: CYP2) e as subfamílias são indicadas por uma letra (CYP2D). A enzima individual é caracterizada por um algarismo arábico, como em CYP2D6 (POOLSUP *et al.*, 2000).

Membros únicos das subfamílias representam um gene em particular (*CYP2D6*, por exemplo). Um asterisco seguido de um número designa o alelo (*1 e *2, dois alelos). O alelo *1 é conhecido como o tipo-selvagem (*wild-type*) e denota atividade enzimática normal (ROGERS *et al.*, 2002).

Existem pelo menos 57 genes CYP em humanos e aproximadamente o mesmo número de pseudogenes, os quais estão agrupados em 18 famílias e 44 subfamílias de acordo a similaridade das suas sequências (ZANGER *et al.*, 2008). O fígado contém a maior quantidade das CYPs, sendo que elas também são expressas no trato gastrointestinal e em pequenas proporções nos pulmões, rins e sistema nervoso central (NEVE, INGELMAN-SUNDBERG, 2008).

O mecanismo da oxidação das substâncias pelo sistema do citocromo P450 envolve um complexo ciclo, porém o efeito final global da reação é simples. Em geral, reação catalisada pelas enzimas do citocromo P450 apresentam a seguinte estequiometria (POOLSUP *et al.*, 2000):



Esta reação exige a presença do substrato (“RH”) da enzima P450, de oxigênio molecular (O₂), NADPH e uma flavoproteína (NADPH-P450 redutase). O ferro heme se liga ao oxigênio no sítio ativo da CYP, onde a oxidação dos substratos ocorre.

Elétrons são cedidos pela enzima NADPH-P450 redutase e seu co-fator, NADPH. O metabolismo de um substrato pela CYP consome uma molécula de O_2 e produz um substrato oxidado e uma molécula de água (Figura 2) (MARTINUS *et al.*, 2000; HANG *et al.*, 2003).

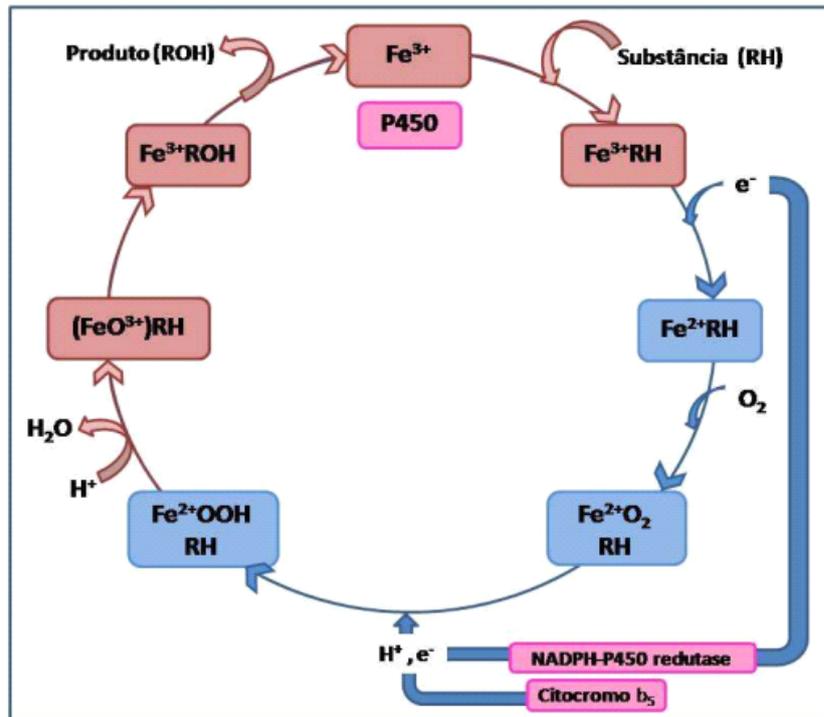


Figura 2 - Ciclo catalítico de CYP450. Fonte: HANG, *et al.*, 2003.

A Figura 2 demonstra que o P450, que contém ferro na forma férrica (Fe^{3+}), combina-se com uma molécula de medicamento (RH), recebe um elétron da NADPH-P450 redutase, que reduz o ferro a Fe^{2+} , combina-se com o oxigênio molecular, um próton e um segundo elétron (da NADPH-P450 redutase ou do citocromo b_5) para formar um complexo $Fe^{2+}OOH \cdot RH$. Esse complexo combina-se com outro próton, produzindo água e um complexo oxeno férrico $(FeO)^{3+} \cdot RH$. O $(FeO)^{3+}$ extrai um átomo de hidrogênio do RH, com formação de um par de radicais livres de vida curta, liberação do xenobiótico oxidado (ROH) do complexo e regeneração da enzima P450 (HANG, *et al.*, 2003).

Entre as diversas reações feitas pelas CYPs em mamíferos, estão a N-desalquilação, O-desalquilação, hidroxilação aromática, N-oxidação, S-oxidação, desaminação e desalogenação (BRUNTON, PARKER, 2008). As CYPs estão envolvidas no metabolismo de xenobióticos, componentes alimentares, além da síntese de substâncias endógenas derivadas do colesterol (hormônios esteroidais e

ácidos biliares). As CYPs que metabolizam xenobióticos possuem a capacidade de metabolizar um grande número de moléculas estruturalmente diferentes. Isto é devido às múltiplas formas de CYPs e à capacidade de uma única CYP metabolizar substratos estruturalmente diferentes. Um único composto pode ser metabolizado por várias CYPs e CYPs podem metabolizar um único composto em várias posições (HANG, *et al.*, 2003).

Esta versatilidade das CYPs é devida ao seu grande e fluído sítio de ligação ao substrato, ocorrendo a um custo de relativa diminuição nas taxas de catalisação. A grande especificidade de substratos das CYPs é uma das razões para a alta frequência de interações medicamentosas. Quando dois medicamentos que são metabolizados pela mesma CYP são administrados em conjunto, eles competem pelo sítio ativo da enzima. Isto pode resultar na inibição do metabolismo de um ou ambos os medicamentos, levando ao aumento dos níveis plasmáticos. Para medicamentos com um pequeno índice terapêutico, uma elevada concentração plasmática pode causar toxicidade e interações medicamentosas são as principais causas de reações adversas aos medicamentos (ADRs, *adverse drug reaction*) (BRUNTON, PARKER, 2008).

De acordo com Lynch *et al.* (2007), o conhecimento do fenótipo de resposta ao medicamento deve ser aplicado para evitar as interações medicamentosas que podem resultar em alterações no metabolismo das enzimas CYP450. Em indivíduos considerados metabolizadores lentos (PMs, *poor metabolizer*), as ADRs podem ser agravados com a adição de um inibidor das enzimas do citocromo na sua terapia. Medicamentos que causam interações metabólicas com o P450 são referidos como inibidores ou indutores.

Os polimorfismos das enzimas do citocromo P450 têm um grande efeito nas variações das respostas a medicamentos utilizados no tratamento de muitas doenças tais como: depressão, psicoses, câncer, doenças cardiovasculares e gastrointestinais, dor, epilepsia, entre outras, sendo que estas enzimas são responsáveis por cerca de 80% de todo o metabolismo de fase 1 (INGELMAN-SUNDBERG, *et al.*, 2007).

Conforme pode ser observado na figura 3, as enzimas CYP2C9, CYP2C19 e CYP2D6 são responsáveis pelo metabolismo de mais de 40% dos 200 medicamentos mais prescritos nos Estados Unidos (ZANGER *et al.*, 2008).

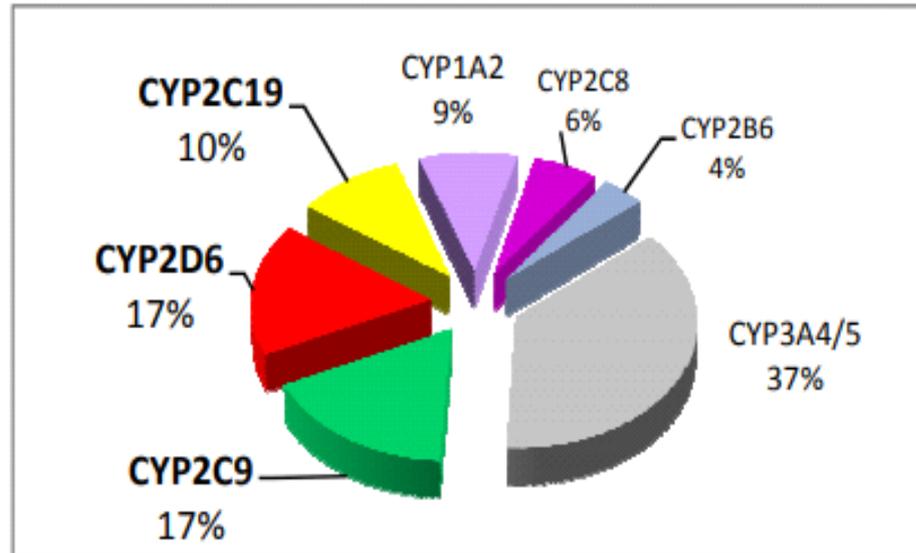


Figura 3 - Percentual de CYPs responsáveis pelo metabolismo de fase 1 dos 200 medicamentos mais prescritos nos EUA. Fonte: ZANGER *et al.*, 2008.

Os metabólitos dependentes do citocromo P450 (CYP) do ácido araquidônico (AA), como os ácidos epoxieicosatrienóicos e o ácido 20-hidroxeicosatetraenóico, servem como segundos mensageiros de vários hormônios e fatores de crescimento e desempenham papéis fundamentais na regulação da função vascular, renal e cardíaca (KONKEL, 2011). Praticamente todas as principais isoformas CYP metabolizantes de AA aceitam uma variedade de outros ácidos graxos poliinsaturados (PUFA), incluindo os ácidos linoléico eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA), como substratos alternativos eficientes.

Os metabólitos desses PUFAs alternativos também provocam profundos efeitos biológicos. As enzimas CYP respondem a alterações no comprimento da cadeia e na estrutura de ligação dupla de seus substratos, com mudanças notáveis na região e estereosseletividade da formação do produto (KONKEL, 2011). A ligação dupla ômega-3 que distingue EPA e DHA de suas contrapartes ômega-6 fornece um local de epoxidação preferido para os membros das subfamílias CYP1A, CYP2C, CYP2J e CYP2E. As enzimas CYP4A (que funcionam predominantemente como AA-hidroxilases) mostram atividades amplamente aumentadas (ω -1)-hidroxilase em relação ao EPA e DHA.

Tomados em conjunto, esses achados indicam que as vias de sinalização dependentes do CYP são altamente suscetíveis a alterações na biodisponibilidade relativa dos diferentes PUFAs e podem fornecer novas informações sobre os complexos mecanismos que relacionam os ácidos graxos alimentares essenciais ao

desenvolvimento de doenças cardiovasculares (KONKEL, 2011).

2.2 GENE *CYP2C9*

O gene *CYP2C9* (Citocromo P450, família 2, subfamília C, polipeptídeo 9) é expresso principalmente no fígado, em níveis que são os mais elevados entre as enzimas CYP2C, e representa cerca de 20% de todas as CYPs hepáticas (INGELMANSUNDBERG, *et al.*, 2007). A enzima *CYP2C9* é uma proteína de 490 aminoácidos, codificada pelo gene *CYP2C9* que possui 8 éxons e está localizado no cromossomo 10 (10q23.33). Este gene possui 50.346 pares de bases. Até o momento, cerca de 41 variações alélicas foram identificadas para *CYP2C9* (NCBI, 2020). Os substratos da *CYP2C9* geralmente são ácidos fracos com um hidrogênio acceptor (ZANGER *et al.*, 2008).

Esta enzima está envolvida no metabolismo de aproximadamente 10% dos medicamentos incluindo alguns com pequeno índice terapêutico. Seus substratos incluem os hipoglicemiantes orais, anti-inflamatórios não esteroidais, diuréticos, anticonvulsivantes, inibidores de angiotensina II, antidepressivos, anticoagulantes orais (como a warfarina) entre outros (DALY *et al.*, 2017). Além disso, esta enzima está envolvida no metabolismo de substratos endógenos como o ácido araquidônico e o linolênico (INGELMAN-SUNDBERG *et al.*, 2007; ZHOU *et al.*, 2008).

A respeito das variações genéticas, é bem conhecido o fato dos polimorfismos de *CYP2C9* apresentarem consequências funcionais na farmacocinética *in vitro* e *in vivo*, na resposta terapêutica e ADRs. Dentre as variantes descritas para este gene, parece que apenas os alelos *2 e *3 determinam seu comportamento polimórfico (Ingelman-Sundberg *et al.*, 2007). As variações alélicas *4 e *5 são pouco frequentes e a relevância clínica das mesmas ainda é pouco conhecida (KIM *et al.*, 2009).

A primeira variação alélica identificada foi o *CYP2C9**2, que apresenta um polimorfismo de base única (*SNP*, *Single Nucleotide Polymorphisms*) na posição 430C>T (éxon 3), que causa uma troca de aminoácido (Arg144Cys) provocando uma diminuição de aproximadamente 20 a 30% da atividade enzimática de *CYP2C9*. O alelo *CYP2C9**3 apresenta um *SNP* no éxon 7 (1075A>C), o que também leva a uma troca de aminoácido (Ile359Leu), podendo causar uma redução de 70% da atividade enzimática de *CYP2C9* (ZHOU *et al.*, 2008).

As frequências dos alelos *CYP2C9**2 e *CYP2C9**3 variam entre diferentes

populações (Tabela 1). Kirchheiner e Brockmoller (2005) relatam que os alelos *2 e *3 estão presentes principalmente em caucasianos (11% e 7% respectivamente) enquanto que em africanos, a frequência é menor (4% e 2% respectivamente). Em asiáticos, a frequência do alelo *3 é de 3% e o alelo *2 não foi encontrado.

Tabela 1 - Frequências (%) alélicas para CYP2C9 em diferentes populações

Populações	Alelos		Referência
	*2	*3	
África Oriental	4,3	1,2	Sistonen <i>et al.</i> (2009)
Norte da África	13,4	10,2	Sistonen <i>et al.</i> (2009)
Europa	13,1	6,7	Sistonen <i>et al.</i> (2009)
Oeste da Ásia	8,6	9,0	Sistonen <i>et al.</i> (2009)
Sul da Ásia	0,6	3,0	Sistonen <i>et al.</i> (2009)
Norte da América	1,5	3,0	Sistonen <i>et al.</i> (2009)
América Central	7,0	4,0	Sistonen <i>et al.</i> (2009)
América do Sul	5,7	4,4	Sistonen <i>et al.</i> (2009)
Brasil	8,6	6,5	Vianna <i>et al.</i> (2004)

Os alelos *2 e *3 afetam a depuração de diferentes medicamentos tais como: S-acenocumarol, S-warfarina, glimepirida, tolbutamida, losartana, celecoxibe, diclofenaco, ibuprofeno, tenoxicam, fluvastatina e fenitoína (KIRCHHEINER, BROCKMOLLER, 2005).

O alelo *3 parece ter um maior efeito na farmacocinética do que o alelo *2. Para a maioria dos substratos, indivíduos heterozigotos com um alelo *3 têm aproximadamente 50% da depuração do alelo normal e homozigotos *3 tem uma redução de 5 a 10 vezes da depuração. Para o alelo *2, foi detectado um efeito significativo na depuração dos medicamentos S-warfarina, acenocumarol, tolbutamida e celecoxibe. Isto sugere que existe uma diferença na especificidade de substrato para as enzimas codificadas pelos alelos *1 (selvagem), *2 e *3. Desse

modo, os polimorfismos de *CYP2C9* são clinicamente significantes e também substrato dependentes (INGELMAN-SUNDBERG *et al.*, 2007).

De acordo com Zanger *et al.* (2008), estudos têm demonstrado a significância clínica dos alelos *2 e *3 para a maioria dos substratos já mencionados. Os autores exemplificam que indivíduos que possuem alelos *2 e *3 tiveram maiores incidências de reações adversas aos medicamentos como hipoglicemia (devido ao uso de hipoglicemiantes), sangramentos gastrointestinais (decorrentes da utilização de anti-inflamatórios não esteroidais) e severa hemorragia (relacionada ao tratamento com warfarina), onde a resposta anticoagulante também depende de variantes no gene da vitamina K epóxido redutase.

O antagonista de vitamina K, warfarina, é o anticoagulante oral mais prescrito para o tratamento de tromboembolismo venoso e das trombozes arteriais. Este anticoagulante é caracterizado por um pequeno índice terapêutico que varia muito entre os pacientes. A warfarina inibe a enzima vitamina K epóxido-redutase codificada pelo gene *VKORC1* (SINGH *et al.*, 2007).

No metabolismo da warfarina os alelos *2 e *3 codificam enzimas que apresentam aproximadamente 12% e 5%, respectivamente, da capacidade enzimática normal. Desse modo, ambos os alelos têm um efeito substancial na depuração deste medicamento. Indivíduos homozigotos para o alelo *3 mostraram uma redução de 90% na eliminação da S-warfarina em comparação com homozigotos para o alelo selvagem (ZHOU *et al.*, 2008).

Recentemente, foi descrito que a Citocromo P450 (CYP) 2C9, enzima que é o produto do gene polimórfico *CYP2C9*, é responsável pelo catabolismo de diversos fármacos e xenobióticos, influenciando fortemente o surgimento do câncer (DALY *et al.*, 2017).

A proteína *CYP2C9* está intimamente ligada à metabolização de substâncias específicas (anti-inflamatórios, anticoagulantes, entre outros), e a sua inibição pode levar a quadros importantes de doenças causadas pelo acúmulo de toxinas. Conforme já descrito, o gene codificante *CYP2C9* é altamente polimórfico e mais de 27 polimorfismos já foram descritos em suas regiões reguladoras e codificantes (KING *et al.*, 2004; VIANNA-JORGE *et al.*, 2004; PERINI *et al.*, 2005, PERINI *et al.*, 2008; DALY *et al.*, 2017). Duas dessas variantes, *CYP2C9**2 (C430T) e *CYP2C9**3 (A1075C) têm sido extensamente investigadas nos últimos anos (KING *et al.*, 2004; VIANNA-JORGE *et al.*, 2004; PERINI *et al.*, 2005, PERINI *et al.*, 2008; DALY *et al.*,

2017).

A influência do ambiente no aparecimento de doenças, em especial no câncer, é frequentemente estudada através da avaliação da metilação global do DNA (COLLOTTA *et al.*, 2013). Relatos da literatura afirmam que níveis globais de metilação do DNA estão inversamente associados aos níveis sanguíneos de poluentes orgânicos persistentes (POPs) e xenobióticos ambientais que se acumulam principalmente no tecido adiposo (COLLOTTA *et al.*, 2013; KIM *et al.*, 2010).

Um grande número de polimorfismos genéticos em genes responsáveis por codificar enzimas da família das Citocromo P450 têm sido descritos e caracterizados. Novos estudos têm demonstrado que indivíduos afetados podem perder a atividade das enzimas P450 ou possuir maior ou menor atividade enzimática de acordo com a presença de certas variantes alélicas. Esses indivíduos podem ter um risco aumentado em desenvolver efeitos adversos a alguns medicamentos ou doenças associadas à exposição aos xenobióticos, principalmente câncer (SAMSEL, SENEFF, 2013a; SAMSEL, SENEFF, 2013b; SAMSEL, SENEFF, 2015).

Diversos artigos correlacionam a exposição aos agrotóxicos e sua associação ao risco aumentado de câncer de próstata, pele, pulmão, mama, cabeça e pescoço, leucemia linfoblástica aguda, mieloma múltiplo e sua importante modulação por polimorfismos genéticos das enzimas Citocromo P450 (KRAJINOVIC *et al.*, 1999; MCDUFFIE *et al.*, 2001; DE ROOS *et al.*, 2005; ERIKSSON *et al.*, 2008; TIMOFEEVA *et al.*, 2009; ALAVANJA, 2012; KUMAR *et al.*, 2014; HE, FENG, 2015; VAZQUEZ *et al.*, 2017; BAI *et al.*, 2017).

2.3 GLIFOSATO E CYP2C9

A família P450 de enzimas CYP tem um *design* de assinatura caracterizado como FGxGRHxCxG (também conhecido como CXG), com dois e, frequentemente, três resíduos de glicina altamente conservados (SYED, MASHELE, *apud* GUNATILAKE, SENEFF, ORLANDO, 2019). Este *design* está localizado no centro de ligação de ferro ao heme, e a síntese do heme também é interrompida pelo glifosato através da sua inibição competitiva da glicina como substrato à reação catalisada pela ácido δ-aminolevulínico sintase. O glifosato também interfere a síntese do heme, porque foi demonstrado que ele bloqueia o primeiro passo da via que utiliza a glicina como

substrato para sintetizar o anel pirrol, um componente básico do heme, sendo que a deficiência do heme pode levar à supressão das CYPs em geral (Kitchen, Witt, Rieck, *apud* GUNATILAKE, SENEFF, ORLANDO, 2019). A quelação de ferro pelo glifosato também pode prejudicar a biodisponibilidade do ferro. Recentemente, foi descrito que o glifosato destrói enzimas CYP450 através do ataque ao seu centro heme assim como interferência direta através da nitrosilação de seu centro ativo (p450) (SAMSEL, SENEFF, 2015).

Outrossim, foi demonstrado que o agrotóxico glifosato inibe a atividade da enzima CYP2C9 de microsomas de fígado humano (ABASS, TURPEINEN e PELKONEN, 2009; ELMADANI *et al.*, 2011.).

As enzimas CYP também dependem do cofator NADPH, que desempenha um papel essencial na divisão do dímero de oxigênio para adicionar um único átomo de oxigênio ao substrato. Um resíduo de glicina altamente conservado forma uma ligação de hidrogênio da cadeia principal com fosfato no local de ligação ao FMN (mononucleotídeo de flavina) da proteína acessória, citocromo P450 redutase, necessária para a atividade catalítica de todas as enzimas CYP (ZHAO *et al.*, *apud* GUNATILAKE, SENEFF, ORLANDO, 2019). Tanto as enzimas CYP quanto a CYP redutase possuem locais de ligação ao NADP (H), uma molécula fosforilada. O NADP (H) é sintetizado no fígado a partir do triptofano, um produto direto da via do shiquimato que o glifosato interrompe (FUKUWATARI, SHIBATA; BIEFER, VASUDEVAN, ELKHAL *apud* GUNATILAKE, SENEFF, ORLANDO, 2019). Portanto, não surpreende que tenha sido demonstrado que o glifosato suprime altamente a atividade da enzima CYP no fígado de ratos (HIETANEN, LINNAINMAA, VAINIO *apud* GUNATILAKE, SENEFF, ORLANDO, 2019).

Além disso, foi descrito que o agrotóxico glifosato interfere na função enzimática das CYPs impedindo a detoxificação de múltiplos outros agentes carcinogênicos, aumentando seu potencial carcinogênico (SAMSEL, SENEFF, 2015), sendo que as evidências da carcinogenicidade do glifosato são convincentes e multifatoriais (ABASS, TURPEINEN, PELKONEN, 2009; SWANSON *et al.*, 2014; MESNAGE *et al.*, 2015; SAMSEL, SENEFF, 2015). Samsel e Seneff (2015) observaram que o glifosato também pode estar relacionado à morte da flora intestinal em mamíferos, além da capacidade de quelagem de metais essenciais em vias metabólicas importantes no organismo como o Manganês (Mn), além da sua possível ligação com o surgimento do linfoma não-hodgkin (GUYTON, 2015).

2.4 USO DE AGROTÓXICOS

O uso de agrotóxico na agricultura familiar começou a se difundir principalmente nos últimos trinta anos, e o Brasil, está entre os maiores consumidores de agrotóxicos no mundo. Em 2008, o Brasil ultrapassou os Estados Unidos e assumiu o posto de maior mercado mundial de agrotóxicos (ABRASCO, 2012; CASAL, *et al.*, 2014).

A população analisada de agricultores alegou fazer uso de diversos praguicidas nas lavouras. Além do glifosato (praguicida mais utilizado), destacamos, dentre as várias substâncias, as que tiveram maiores relatos de uso, foram elas: flutriafol, ciproconazol e tiametoxam.

O flutriafol, nome químico: (RS)-2,4'-difluoro-a-(1H-1,2,4-triazol-1-ylmethyl) benzhydryl alcohol, é um praguicida pertencente a classe dos fungicidas com a classificação toxicológica III. Possui aplicação foliar nas culturas de aveia, banana, melão, soja e trigo; aplicação no solo na cultura do café; e aplicação em sementes de trigo (ANVISA, 2003).

O ciproconazol, nome químico: (2RS,3RS;2RS,3SR)-2-(4-chlorophenyl)-3-cyclopropyl-1-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)butan-2-ol, assim como o flutriafol, pertence à classe dos fungicidas com a classificação toxicológica específica para cada produto, conforme art. 38 da Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 294, de 29 de julho de 2019. A sua aplicação na agricultura é foliar nas culturas de algodão, alho, arroz, aveia, café, cevada, crisântemo, eucalipto, figo, girassol, goiaba, maçã, melancia, melão, milho, pêssego, soja, sorgo, trigo e uva; aplicação no solo na cultura de café; aplicação através de tratamento industrial de propágulos vegetativos (mudas) antes do plantio na cultura de cana-de-açúcar; e aplicação no sulco de plantio na cultura de cana-de-açúcar (ANVISA, 2019).

O tiametoxam, nome químico: 3-(2-chloro-1,3-thiazol-5-ylmethyl)-5-methyl-1,3,5-oxadiazinan-4-ylidene(nitro)amine, é um praguicida pertencente a classe dos inseticidas, com a classificação toxicológica III. A sua aplicação na agricultura é no solo nas culturas de abacaxi, abobrinha, alface, amendoim, arroz, batata, berinjela, café, cana-de-açúcar, citros, feijão-vagem, fumo, maçã, mamão, melancia, melão, morango, pepino, pêssego, pimentão, repolho, tomate e uva; aplicação em sementes de alface, algodão, amendoim, arroz, aveia, batata, cebola, cevada, feijão, girassol, melão, milho, pastagem, soja, sorgo, tomate e trigo; aplicação foliar nas culturas de alface, algodão, alho, alho-poró, agrião, amendoim, arroz, aveia, batata,

berinjela, cana-de-açúcar, cebola, cebolinha, cevada, citros, coentro, crisântemo, ervilha, feijão, figo, fumo, girassol, maçã, mamão, mandioca, manga, melancia, melão, milho, morango, palma forrageira, pastagem, pepino, pimentão, repolho, rosa, soja, sorgo, tomate, trigo e uva; aplicação no tronco de citros; aplicação por imersão de pedúnculos de abacaxi e de mudas de eucalipto; aplicação em tratamento de mudas na bandeja antes do plantio nas culturas do fumo e melão; aplicação no solo, em sulco de plantio e através de tratamento industrial de propágulos vegetativos (mudas) antes do plantio na cultura de cana-de-açúcar; e aplicação em sulco de plantio na cultura de milho (ANVISA, 2019).

Para a Associação Brasileira de Saúde Coletiva, o processo produtivo agrícola brasileiro está cada vez mais dependente dos agrotóxicos. Os resíduos tóxicos estão presentes em muitos produtos alimentícios, principalmente nos alimentos processados que têm como ingredientes os derivados de trigo, milho e soja, provocando o aumento da insegurança alimentar para o mercado consumidor (ABRASCO, 2012).

Entre os mais contaminados, estão os alimentos *in natura*, registrando-se que os vegetais e frutas disponíveis no mercado apresentam um aspecto agradável, embora contenha em sua película externa grande quantidade de agrotóxicos utilizados para sua produção (PARA, 2014). O uso de defensivos agrícolas em grande escala afeta a saúde da população e o meio ambiente, gerando contaminação do solo, do ar, da água, das nascentes e dos aquíferos (EMBRAPA, 2011).

Grande parte dos agrotóxicos aplicados na agricultura tende a escoar principalmente nas águas superficiais e subterrâneas, além de ficarem dispersos na atmosfera. São vários os fatores de degradação ambiental que ocorre com a dispersão de agrotóxicos no ambiente, um dos principais problemas apresentados é a mineralização completa da molécula ou geradores de metabólitos e produtos de degradação (EMBRAPA, 2011).

A agricultura familiar é responsável pela produção de diferentes gêneros alimentícios, que atendem às necessidades dos consumidores e da própria família. As práticas para o autoconsumo e a comercialização se mantêm, principalmente, no âmbito da agricultura familiar e vêm representando estratégias importantes de geração de renda e de segurança alimentar e nutricional para os agricultores e também para os consumidores (BADALOTTI, RENK, FILIPPIN, 2007).

É nessa perspectiva da segurança alimentar e de minimização dos efeitos dos

agrotóxicos sobre a saúde que os agricultores respeitam o período de carência referente à aplicação de agrotóxicos, compreendido como o número de dias entre a última aplicação e a colheita. Este período é estabelecido de acordo com as informações do fabricante disponíveis nos rótulos das embalagens de cada produto, recomendado e certificado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (EMBRAPA, 2010).

Tal como foi relatado pelos agricultores familiares, o período de carência, quando do uso de agrotóxicos, tem sido observado na produção de alimentos, pois reconhecem como essencial o cumprimento deste tempo para que o alimento não contenha quantidade elevada de resíduos, tornando-se prejudicial à saúde. A comercialização dos produtos agrícolas, cujo índice de agrotóxicos está acima do permitido, caracteriza comercialização de alimentos de forma ilegal e, por isso, é necessário levar em consideração o período de carência para a comercialização e o consumo (ABRASCO, 2012).

Em relação aos riscos de trabalhar com agrotóxicos, todos os produtores rurais entendem que há periculosidade. A prática do uso de equipamento de proteção individual é seguida parcialmente pelos trabalhadores, relatando que a indevida utilização dos equipamentos de proteção individual se dá pelo desconforto térmico e dificuldade de locomoção. Por essas razões, apesar do perigo que representa, é comum deparar-se com trabalhadores rurais sem o uso de equipamentos durante a aplicação e manuseio desses produtos (MORI *et al.*, 2015).

A aplicação de agrotóxicos requer equipamentos que propiciem a segurança do trabalhador, no entanto, ainda são frequentes as aplicações com pulverizador costal. Essa técnica expõe de forma direta o agricultor pelo contato do equipamento com o corpo e pelo tempo durante o qual o produtor fica exposto ao agrotóxico, especialmente considerando a frequência de aplicação que pode chegar a oito vezes por mês. A aplicação realizada com tratores diminui parcialmente os riscos de intoxicação, pois os trabalhadores ficam em uma posição mais afastada dos agrotóxicos se comparada à situação de uso de pulverizadores costais (ABRASCO, 2012; LONDRES, 2011).

Quanto à segurança, constatou-se que os agricultores nem sempre utilizam equipamento de proteção individual. Percebe-se que há uma preocupação e cuidado com a saúde no momento da aplicação desses produtos, porém, não são todos os agricultores que usam proteção como preconiza a Embrapa (2003), ao recomendar o

uso de máscaras protetoras, óculos, chapéu de abas largas, macacão com mangas compridas e avental impermeável. Um estudo semelhante realizado por Bohner, Araújo e Nishijima (2013), no município de Chapecó-Santa Catarina, também indicou que nem todos os agricultores usam equipamento de proteção individual quando realizam aplicação de agrotóxicos.

O Censo Agropecuário de 2017 (IBGE, 2017) mostrou um aumento significativo na quantidade de estabelecimentos que começaram a usar agrotóxicos, traduzidos no aumento de 20,4% no número de lugares. Além disso, ficou evidente no estudo um aumento similar em agricultores analfabetos que passaram a aplicar produtos agrotóxicos no campo.

Os produtores que usavam agrotóxicos e eram alfabetizados somam-se em 69,6 %, com ensino fundamental, no máximo. Dentre esses, 30,6% afirmaram ter recebido orientação técnica sobre a aplicação do produto. Já dentre os analfabetos cerca de 89% deles declararam nunca ter ouvido as orientações técnicas (IBGE, 2017). De certa forma, essa falta de instrução acaba resvalando na preocupação, para além do próprio produto em si, sobre a manipulação dos agrotóxicos.

2.5 DOENÇAS CAUSADAS POR AGROTÓXICOS

A Agência Internacional para Pesquisa do Câncer (*International Agency for Research on Cancer*, IARC) publicou um estudo em março de 2015 (GUYTON, 2015) classificando o glifosato como um “provável agente cancerígeno”.

Em dezembro de 2017, Robert Tarone, matemático estatístico da Agência de Proteção Ambiental Americana, publicou um artigo que refutava o estudo da IARC, que, segundo ele, haviam falsificações nos dados. O artigo do cientista (TARONE, 2017) via a classificação da IARC sobre o glifosato como incompleta e defeituosa, em que o autor salientava que os esforços para a prevenção do câncer deveriam ser cientificamente fundamentados em relação ao potencial cancerígeno dos produtos suspeitos. Enquanto o relatório da IARC afirmava que o glifosato poderia ser um grande perigo, o artigo de Tarone contrapunha à probabilidade de desenvolvimento de câncer após a exposição ao referido agrotóxico. O painel da IARC, descreveu Tarone, deu destaque a resultados positivos no que diz respeito à provável carcinogenicidade do glifosato em estudos com roedores, em detrimento dos resultados negativos.

Recentemente, Geoffrey Kabat (2017) publicou um artigo no site da Forbes comentando o caso. Para ele, as revelações de Tarone (2017) sobre a publicação da IARC foram um alívio, pois cientistas e agências deveriam ser transparentes e imparciais. Além disso, apontou para as questões de alto risco envolvidas, como recompensas financeiras e outros conflitos de interesses obscuros.

Apesar do conflito de interesses descrito acima, a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC) classificou o glifosato como “provável agente cancerígeno” e o estado da Califórnia seguiu o exemplo, listando-o como um “provável agente cancerígeno” que requer rotulagem.

Em um período de menos de um ano, de agosto de 2018 a junho de 2019, três processos bem-sucedidos na Califórnia envolvendo umnexo de causalidade entre a utilização de glifosato e o surgimento de linfoma não-Hodgkin resultaram em indenizações de mais de dois bilhões de dólares americanos. Isso causou uma queda drástica no valor das ações de uma das maiores empresas de farmacos do mundo, uma vez que a mesma adquiriu outra grande empresa de produtos agrícolas pouco antes de esses processos serem litigiosos. Em julho de 2019, a Áustria se tornou o primeiro país europeu a proibir o glifosato para todos os usos (Avramova *apud* GUNATILAKE, SENEFF, ORLANDO, 2019).

A literatura mostra associação das neoplasias do sistema nervoso central (SNC) com a ocupação, acometendo trabalhadores da indústria petroquímica, lavradores e embalsamadores com maior incidência que outras profissões sem exposição química (ALAVANJA, 2005; CLAPP, 2006; LEE *et al.*, 2005; NICHOLS; SORAHAN, 2005). Em relação aos tumores cerebrais, os trabalhos de Remontet e colaboradores (2003) e Baldi e colaboradores (2011), observaram uma incidência maior de meningioma e mais recentemente ao glioma em indivíduos expostos a aditivos agrícolas. Somado a estes, trabalhos mais recentes também sugerem o risco de tumor cerebral em associação à exposição a pesticidas em populações com proximidade de culturas agrícolas (CHEN *et al.*, 1998), no entanto, as vias moleculares que estabelecem esta associação ainda não foram definidas.

Em uma perspectiva brasileira, o estudo epidemiológico de Miranda-Filho e colaboradores (2014), realizado na região agrícola do estado do Rio de Janeiro, também observou uma maior tendência na mortalidade por câncer ao longo do tempo entre indivíduos expostos aos agrotóxicos.

Os agrotóxicos usados na agricultura (inseticidas, herbicidas, fungicidas) e no

ambiente doméstico (raticidas, moluscocidas, fumigantes) estão associados a efeitos graves à saúde, causando intoxicações agudas e crônicas (ABRASCO, 2012).

Os sintomas relacionados às intoxicações agudas ocorrem de forma rápida, logo após a exposição, ocasionando dores de cabeça, sangramento nasal, fraqueza, tontura, espasmos musculares, náuseas e vômitos. Já os sintomas crônicos surgem após meses, anos ou décadas de exposição e podem estar relacionadas com o desenvolvimento de várias doenças, incluindo efeitos neurotóxicos, lesões hepáticas e renais, dentre outras (LONDRES, 2011; ABRASCO, 2012).

Os impactos nos processos produtivos da agricultura familiar de maior relevância para a saúde humana e ambiental são as poluições, contaminações ambientais e as intoxicações agudas e crônicas relacionadas à aplicação de agrotóxicos, visto que nem sempre as práticas produtivas são coerentes com as preocupações do impacto ambiental ou expressam visão de sustentabilidade (ABRASCO, 2012).

A agricultura familiar tem se apresentado, historicamente, como uma forma de organização dos meios de produção e um modo de vida fundamental para a reprodução social dos agricultores (BADALOTTI, RENK, FILIPPIN, 2007).

Este cenário evidencia a relevância que assumem as questões relativas ao uso e manuseio de agrotóxicos nesta região, reforçando-se que inadequações neste campo podem, a médio e longo prazo, gerar níveis de contaminação do ambiente de difícil reversão, com conseqüente implicação na saúde humana (EPAGRI, 2014).

A exposição a agrotóxicos aliada ao uso indiscriminado dos mesmos, é explicitado na literatura como responsável por diversos sintomas, doenças físicas e emocionais. Os sintomas frequentes causados por intoxicações agudas são identificados por náuseas, cefaléia, irritabilidade, desorientação, dores no peito, vertigem, taquicardia, fadiga, tontura, irritação na pele, olhos, mucosas e dificuldade respiratória (MENEGAT, FONTANA, 2010; MASCARENHA, PESSOA, 2013).

Em relação à intoxicação crônica, os efeitos emergem da exposição continuada, em longo prazo. Os sintomas iniciam tardiamente e são expressos por comprometimentos irreversíveis, na maioria dos casos. Neste contexto, destaca-se o surgimento de câncer em agricultores, com origem nos sistemas digestório, reprodutor masculino, imunológico, endócrino, tegumentar, respiratório e urinário (ANDREOTTI *et al.*, 2009; MIRANDA, 2015).

A literatura enfatiza outros agravos à saúde, relacionada à exposição e intoxicação crônica aos agrotóxicos, revelados em doenças cardiovasculares, morbidade

respiratória, doença de Parkinson, transtornos da visão, ansiedade, depressão, confusão mental, hipertensão arterial e efeitos neurológicos diversos, dentre eles, suicídio (BENACHOUR, SÉRALINI, 2008; FAREED, *et al.*, 2013; ALBUQUERQUE, *et al.*, 2015; FURLONG, *et al.*, 2015; SEKHOTHA, MONYEKI, Sibuyi, 2016; CONTI *et al.*, 2018).

Os estudos que correlacionam o surgimento de doenças e o uso de agrotóxicos ainda são inconsistentes, observando-se que ainda existem controvérsias quanto a incidência em relação a população de análise (BARRY *et al.*, 2012). Sendo assim, acredita-se que o padrão epidemiológico do surgimento de doenças associado ao uso de agrotóxico depende da soma de várias variáveis, entre elas: a população de estudo, presença de alterações genéticas de síndromes hereditárias e base química dos agrotóxicos em exposição (BARRY *et al.*, 2012).

Uma pesquisa da Universidade do Texas se empenhou em evidenciar outro efeito do glifosato: O estudar como o mesmo afetava as abelhas. O artigo descreve uma experiência que expôs abelhas a concentrações de glifosato utilizadas comumente em plantações e jardins. Após três dias, eles observaram que o herbicida reduziu significativamente a microbiota intestinal saudável dos insetos. Assim como os seres humanos, as abelhas precisam de um ecossistema de bactérias existindo no seu trato digestivo e o que glifosato faz é matar algumas dessas bactérias, levando a um desequilíbrio que reduz a capacidade do inseto de se defender de infecções e, conseqüentemente, morrendo (MOTTA, RAYMANN, MORAN, 2018). Oito espécies dominantes de bactérias saudáveis nas abelhas foram expostas e, delas, quatro foram descritas como menos abundantes. *Snodgrassella alvi*, a espécie mais atingida, é muito importante para processar os alimentos das abelhas e as defenderem contra patógenos (MOTTA, RAYMANN, MORAN, 2018). Cerca de metade das abelhas com um microbioma saudável continuavam vivas depois de oito dias de exposição, ao passo que um décimo das que tiveram microbiomas alterados conseguiram se manter vivas. A descoberta do artigo leva à discussão proposições já admitidas como absolutas e serve de apoio para diversas críticas que estão diante do agrotóxico mais popular do mundo, há quatro décadas no mercado.

Um artigo publicado na revista *PLOS Medicine*, da Universidade da Califórnia em Davis (EUA), pediu uma intervenção governamental imediata com o banimento do organofosforados, inseticidas amplamente utilizados, assim como o glifosato. Em uma exposição pré-natal, segundo os autores do artigo, leva a uma desordem no

desenvolvimento neurológico. A exposição de mulheres grávidas a níveis baixos de pesticidas organofosforados está ligada a um desempenho baixo na aprendizagem dos nascidos, além de um déficit de memória e atenção (HERTZ-PICCIOTTO *et. al.*, 2018). Esses produtos são usados originalmente no controle de insetos em shoppings, escolas, campos de golfe e fazendas, matando as pragas.

As pessoas acabam entrando em contato com esses produtos químicos na comida, na água e no ar. A pesquisa ainda afirma que os pesticidas organofosforados são detectados na maioria das pessoas. O produto foi projetado para afetar o sistema central, o que leva a crer que atacar o sistema neurológico dos humanos não deveria ser surpresa, mas apenas o passo seguinte (HERTZ-PICCIOTTO *et. al.*, 2018). Depois dos limites que foram determinados para o uso dos organofosforados, sua exposição de fato reduziu, mas os autores alertam que isso não é suficiente. Depois de mais de 30 estudos epidemiológicos e ensaios experimentais em animais e culturas de células, o artigo é determinante: a exposição aos organofosforados antes do nascimento, ainda que nos níveis admitidos como seguros pelos órgãos regulamentadores, está diretamente associada a uma deficiência no desenvolvimento cognitivo, comportamental e social (HERTZ-PICCIOTTO *et. al.*, 2018).

Outro indício dos efeitos nocivos de agrotóxicos é que os mesmos acometem os adolescentes: um estudo recente analisou a relação entre a exposição a pesticidas e o desenvolvimento de depressão em adolescentes. O estudo observou 529 jovens de 11 a 17 anos da região do Andes, Equador, incluindo jovens trabalhadores em lavouras da região. A equipe da pesquisa mediu níveis da enzima acetilcolinesterase (AChE) no sangue, inibida pela toxicidade de alguns agrotóxicos. De acordo com a pesquisa, a enzima é presente em estruturas neurais e também influencia as sinapses no cérebro. Foi constatado que os adolescentes tinham menor atividade de AChE e apresentavam mais sintomas ligados à depressão, com efeito acentuado em meninas e adolescentes menores de 14 anos (SUAREZ-LOPES *et. al.*, 2019).

Comprovando os efeitos nocivos do glifosato, uma pesquisa da Universidade Estadual de Washington provou os impactos do herbicida nas gerações posteriores àquelas expostas ao agrotóxico. A pesquisa de uma equipe liderada por Michael K. Kinner, professor da universidade estadunidense, reuniu filhotes de animais expostos ao agrotóxico. No experimento, fêmeas prenhes ficaram expostas entre o oitavo e décimo quarto dia de gestação. A dose escolhida foi metade da que,

acreditava-se, não causar efeito nocivo à saúde. Isso de fato foi visto, pois não foram registrados efeitos nocivos aparentes sobre os pais ou a primeira geração de filhotes (KINNER *et. al.*, 2019). O quadro mudou quando se observou a segunda e terceira gerações. No caso da segunda, houve aumentos significativos em doenças de testículos, ovários, glândulas mamárias, além de obesidade. Já sobre os animais machos da terceira geração, o estudo observou um aumento de 30% nas doenças na próstata, que representa o triplo da população de controle. A respeito das fêmeas do mesmo grupo, o aumento de 40% acometeu por meio de doenças renais, isto é, quatro vezes a população de controle (KINNER *et. al.*, 2019). Esse fenômeno, nomeado pela pesquisa por “*generational toxicology*” (KINNER *et. al.*, 2019), tem aumentado com os anos de uso de fungicidas, pesticidas, entre outras substâncias. O artigo vê como preocupante a capacidade do glifosato (e outros agentes tóxicos ambientais) em impactar as futuras gerações, igualmente importante à toxicologia da exposição direta (KINNER *et. al.*, 2019).

Além disso, no ambiente terrestre, o glifosato é principalmente biodegradado em ácido aminometilfosfônico (AMPA) quando metabolizado por bactérias nos solos (figura 4) e pode causar vários problemas toxicológicos quando absorvido. O AMPA é muito mais persistente no solo que a substância original e o mesmo pode ser lixiviado para as águas subterrâneas e transformar-se em formaldeído, que é carcinogênico e neurotóxico (BOHRER, 2000).

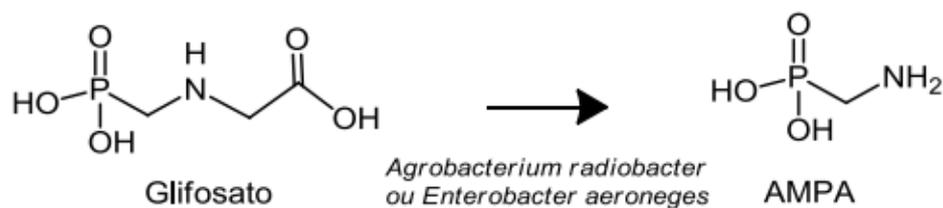


Figura 4 – Conversão de glifosato em AMPA. Fonte: MENDONÇA, 2018.

Recentemente, uma importante pesquisa (CONTI *et al.*, 2018) descreveu o aparecimento de sintomas depressivos relacionado à utilização de agrotóxicos (especialmente glifosato em combinação com outros pesticidas) em trabalhadores rurais do sul do estado do Espírito Santo. Esse mesmo grupo de pesquisadores publicou outro importante estudo (ARCHANJO *et al.*, 2017) em que descreveram a correlação do uso de agrotóxicos e o aparecimento de sintomas como ardor na pele,

presença de catarro, diarreia, dispnéia e salivação. Além disso, foi demonstrado que o número de sintomas relatados pelas mulheres foi maior que nos homens e que o uso de tabaco, agrotóxico, ser mulher, pior saúde autor-relatada e presença de doença crônica são fatores de risco para sintomas depressivos (ARCHANJO *et al.*, 2017).

De acordo os estudos citados acima, observamos que os agrotóxicos têm a capacidade de causar diversas doenças e, portanto, nota-se uma necessidade urgente em se verificar se esse potencial lesivo está relacionado a alterações polimórficas de genes importantes na metabolização de xenobióticos. Foi com esse objetivo que resolvemos avaliar dois importantes polimorfismos de *CYP2C9* em cerca de 300 agricultores da região sul do estado do Espírito Santo, expostos e não expostos aos agrotóxicos. Outrossim, um outro objetivo foi verificar a relação desses mesmos polimorfismos com o surgimento de doenças/sintomas (43 variáveis analisadas ao todo), de acordo com a utilização ou não desses xenobióticos.

3 JUSTIFICATIVA

A utilização de agrotóxicos está relacionada ao surgimento de doenças, e, desse modo, identificar corretamente os fatores capazes de influenciar essa associação, em especial aqueles de natureza genética, abre caminhos para a prevenção.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Verificar a existência de associação entre o uso de agrotóxicos e o desenvolvimento de doenças em lavradores da região Sul do estado do Espírito Santo, e sua associação com os polimorfismos em *CYP2C9*.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a frequência alélica de *CYP2C9**1, *CYP2C9* *2 e *CYP2C9**3 em uma população amostral de agricultores espírito-santenses expostos e não expostos a agrotóxicos;
- Determinar a frequência de metabolizadores normais (A), intermediários (B) e lentos (C) segundo os genótipos de *CYP2C9* na população de estudo;
- Verificar a existência de associação entre o perfil metabolizador de *CYP2C9* e o surgimento de doenças vinculadas ao uso constante de agrotóxicos.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 PERCURSO METODOLÓGICO

O público-alvo do projeto consistiu em agricultores de cidades ao sul do estado do Espírito Santo com exposição diária e constante aos agrotóxicos, em especial ao composto glifosato.

Em relação aos aspectos éticos, este trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) vinculado à Universidade Federal do Espírito Santo e aprovado com o número de parecer 3.378.510 e foram seguidas as resoluções do Conselho Nacional de Saúde nº 466 (de 12 de dezembro de 2012) e nº 510 (de 07 de abril de 2016). Descrevemos como uma referência sucinta os critérios de inclusão no estudo: homens e mulheres maiores de 18 anos, moradores do Sul do estado do Espírito Santo e que atuavam como lavradores na região. Outrossim, os critérios de exclusão: indivíduos que não tiveram condições cognitivas para compreender a pesquisa, aqueles que se recusarem a participar e nas situações em que não foi possível a identificação do local de residência ou a ocupação.

A princípio, foi realizada a aplicação de um questionário (ANEXO I) a cada voluntário, e em seguida, a coleta de sangue. Com o questionário, foram obtidas informações importantes como: idade, sexo, hábito tabagista e/ou etilista, tempo de trabalho no campo, uso de agrotóxicos e a presença de possíveis doenças/sintomas, destacando-se: irritação ocular, lesões na pele/alergias, queimaduras na pele, náuseas/ânsia de vômito, catarro, dor abdominal, diarreia, digestão difícil, chiados, sibilos, asma, inflamações gástricas, doenças hepáticas, alterações na pressão arterial, infertilidade, lacrimejamento, tonturas/vertigens, tosse, falta de ar/dispneia, visão turva, tremores, vômitos, dor nas articulações, hepatite, artrose/osteoporose, doenças renais, doenças respiratórias, déficit de atenção, abortamentos, dor de cabeça, suor excessivo, salivação, agitação/irritabilidade, formigamento, miose, câimbras, dor no corpo/musculatura, depressão, doenças cardiovasculares, câncer, palpitação cardíaca, lesão em glândulas salivares, malformação e hiperatividade.

Após a coleta de sangue, foi realizada a 1ª extração de DNA e depois realizada genotipagem dos voluntários para os polimorfismos *2 (rs1799853) e *3 do gene *CYP2C9* (rs1057910). Com esse levantamento, foi possível realizar a associação entre o surgimento de doenças e o uso de agrotóxicos segundo os genótipos para

os polimorfismos de *CYP2C9* escolhidos. Foram analisadas 304 amostras de DNA extraído de sangue de lavradores moradores da região Sul do estado do Espírito Santo subdivididos em dois grupos:

SIM - Agricultores que utilizam agrotóxicos (caso\teste);

NÃO - Agricultores que não utilizam agrotóxicos (controle).

O material coletado (sangue) foi transportado em gelo e levado ao laboratório onde foi extraído o material genético (DNA).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real para a análise de *CYP2C9* foi realizada segundo o protocolo descrito por Perini (2009) no laboratório de Genética Molecular da Universidade Estadual da Zona Oeste (UEZO), no estado do Rio de Janeiro.

5.2 POPULAÇÃO DE ESTUDO

O estudo foi baseado em análise genotípica do DNA extraído das amostras de sangue de lavradores moradores da região Sul do Estado do Espírito Santo.

A mesorregião Sul Espírito Santense é a segunda mais populosa do estado, formada pela união de 22 municípios, os quais estão agrupados em três microrregiões, com seus respectivos municípios, a saber: Alegre (Alegre, Divino de São Lourenço, Dolores do Rio Preto, Guaçuí, Ibatiba, Ibitirama, Irupi, Lúna e Muniz Freire), Cachoeiro de Itapemirim (Apiacá, Atílio Vivácqua, Bom Jesus do Norte, Cachoeiro de Itapemirim, Castelo, Jerônimo Monteiro, Mimoso do Sul, Muqui, São José do Calçado e Vargem Alta) e Itapemirim (Itapemirim, Marataízes e Presidente Kennedy) (IBGE/CIDADES, 2015).

A extensão territorial do Sul Capixaba é de 8.844,17 km², o que corresponde a 19,19% da área estadual total (IBGE/CIDADES, 2015). Quanto à população sul capixaba, o número de residentes no estado é de 565.934 pessoas, sendo que 72,35% residem em área urbana, enquanto 27,65 residem no meio rural (IBGE, 2015).

Uma vez analisada sob o aspecto do desenvolvimento social, medido pelo IDH, a região apresenta desempenho inferior à média do estado (IBGE/CIDADES, 2015) influenciada muito mais pela variável educação do que pelo nível de renda ou

expectativa de vida da população. Em relação ao rendimento familiar, houve um agravamento da situação traduzido pelos dados oficiais apresentados pelo governo do estado do Espírito Santo, em 2009, que mostraram elevado percentual de famílias dos municípios da região com renda mensal familiar de até 2 salários mínimos (IBGE, 2009).

Os dados supracitados mostram a necessidade de atenção à população do Território Sul Capixaba, com a apresentação de uma proposta de estudo das condições de saúde e a correlação desta variável com o uso de agrotóxicos e o surgimento de doenças de acordo com o polimorfismo de *CYP2C9* em agricultores desta região.

5.3 EXTRAÇÃO DE DNA

A extração e a purificação do DNA foram realizadas por meio de kit comercial Qiagen®, seguindo o seguinte protocolo: 200 µl de amostra (temperatura ambiente, 15-25°C) foram transferidos para o tubo de microcentrifuga, e, foram adicionados 20 µl de proteína do kit Qiagen® e 200 µl de tampão AL (tampão de lise) e foram misturados no vórtex por 15 segundos.

Em seguida, essa mistura foi incubada a 56°C durante 10 minutos, centrifugada por 1 minuto a 1500 rpm e foi adicionado 200 µl de etanol (96-100%) e, na sequência, misturado no vórtex por 15 segundos.

Após isso, centrifugou-se novamente por 1 minuto a 1500 rpm, e, em seguida, transferiu-se a mistura para a coluna com o tubo coletor de 2 ml, que foi centrifugada a 8000 rpm durante 1 minuto. Após essa etapa, descartou-se o filtrado e reutilizou-se o tubo coletor, visto que o DNA estava contido na coluna.

Em seguida, adicionou-se 500 µl de tampão AW1 (tampão de limpeza) na coluna e, em seguida, centrifugou-se a 8000 rpm durante 1 minuto e descartou-se o filtrado, e, o tubo coletor foi reutilizado, visto que o DNA estava contido na coluna.

Após esta etapa, adicionou-se 500 µl de tampão AW2 (tampão de limpeza) na coluna e centrifugou-se a 14000 rpm por 3 minutos. Em seguida, a coluna de centrifugação foi colocada em um microtubo de 1,5 ml e o tubo coletor (que contém o filtrado) foi descartado. Adicionou-se 200 µl de tampão AE (tampão de eluição) e, em seguida, o material foi incubado à temperatura ambiente (15-25°C) durante 1 minuto e, após isso, centrifugado a 8000 rpm durante 1 minuto.

Por último, a coluna foi descartada, visto que o DNA estava contido no microtubo.

5.4 PCR EM TEMPO REAL PARA AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMOS DE *CYP2C9*

Os polimorfismos de *CYP2C9* foram identificados pela técnica de PCR em tempo real conforme descrito anteriormente por Perini e colaboradores (2009). Ensaio TaqMan® validados (Applied Biosystems, EUA) foram utilizados para discriminar os alelos *CYP2C9* * 2 (rs1799853) e *CYP2C9* * 3 (rs1057910).

Para ambos os ensaios, as reações de PCR em tempo real foram realizadas em um volume final de 10 µl contendo 30 ng de DNA, 1X *Taqman Universal Master Mix* (Applied Biosystems, EUA), 1X de cada ensaio específico e H₂O q.s.p.

As condições da PCR foram: desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 92°C por 15 segundos e anelamento a 60°C por 1 minuto. Todas as amostras foram analisadas no aparelho *Fast 7500 Real-Time System* (Applied Biosystems, EUA). Os genótipos foram determinados por meio da análise dos gráficos de discriminação alélica (*allelic discrimination plot*), conforme ilustrado nas Figuras 5 e 6.

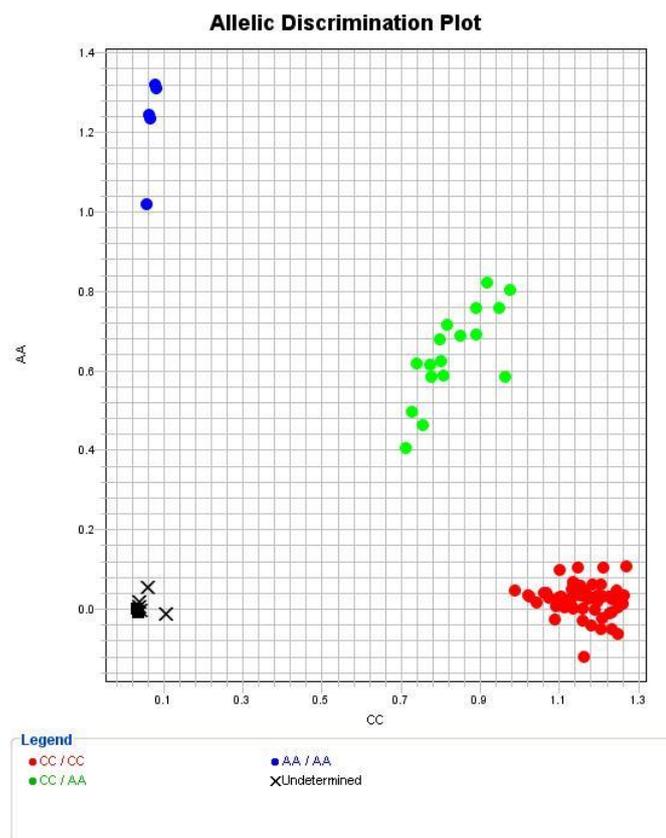


Figura 5 – Gráfico de discriminação alélica (*allelic discrimination plot*) para análise de *CYP2C9**2. Fonte: Próprio autor, 2020.

A figura 5 demonstra um modelo de placa de discriminação alélica em pontos, onde observa-se a quantidade de indivíduos homozigotos selvagens (pontos vermelhos), heterozigotos variantes para o alelo *2 (pontos verdes) e homozigotos variantes para o alelo *2 (pontos azuis).

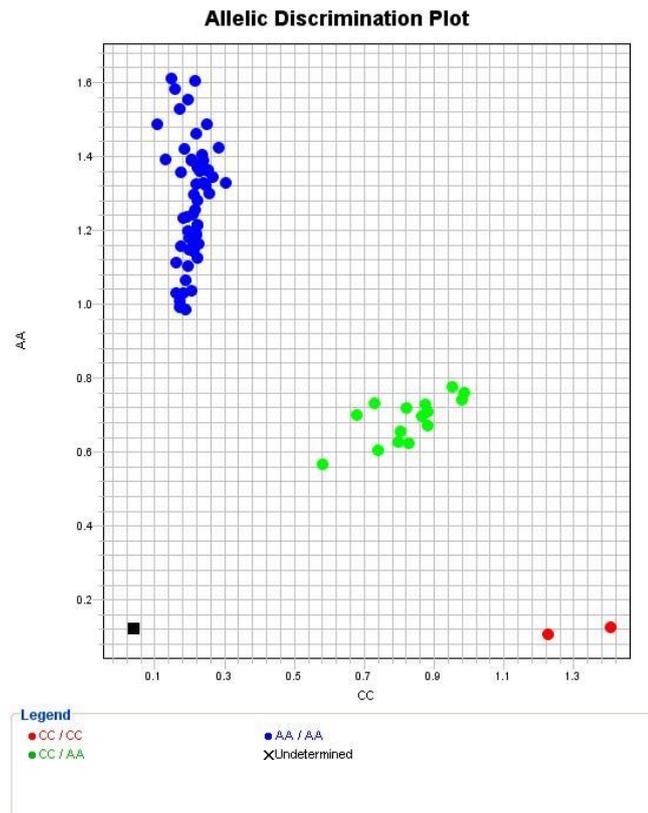


Figura 6 - Gráfico de discriminação alélica (*allelic discrimination plot*) para análise de CYP2C9*3.
Fonte: Próprio autor, 2020.

A figura 6 demonstra um modelo de placa de discriminação alélica em pontos, onde observa-se a quantidade de indivíduos homozigotos selvagens (pontos azuis), heterozigotos variantes para o alelo *3 (pontos verdes) e homozigotos variantes para o alelo *3 (pontos vermelhos).

De acordo com os alelos verificados em cada amostra, os indivíduos foram classificados em diferentes categorias no que tange a inferência de sua capacidade de metabolização:

Categoria	Metabolização	Genótipo(s)
A	Normal	*1/*1 (homozigoto selvagem)
B	Intermediária	1/*2; *1/*3
C	Lenta	*2/*2; *2/*3; *3/*3

5.5 METODOLOGIA DE ANÁLISE DE DADOS

Os dados obtidos foram utilizados para verificar a existência de associação entre o uso de agrotóxicos e os polimorfismos em *CYP2C9* com o surgimento de doenças. Foi realizado um amplo estudo descritivo das variáveis disponíveis com a apresentação de diversas tabelas de contingência simples e de dupla entrada, bem como alguns gráficos que facilitaram a visualização da distribuição dos dados.

Para análise estatística bivariada foram aplicados o teste Qui-quadrado e, quando necessário, o teste exato de Fisher, com margem de erro de 5%.

Ambas são técnicas estatísticas que visam testar a independência entre duas variáveis categóricas (hipótese nula - H_0) por meio das tabelas de contingência 2x2. Em síntese: a hipótese nula (H_0) considerada é que as variáveis são independentes. A diferença entre os dois testes, portanto, trata-se da quantidade amostral: uma vez que o teste Qui-quadrado possui a exigência de um tamanho amostral mínimo, o teste exato de Fisher trabalha de forma mais ampla (neste sentido), sendo assim um teste mais robusto. Ao se aplicar o teste Qui-quadrado para verificar a relação entre duas variáveis categóricas, é necessária uma quantidade mínima de observações para que o mesmo possua poder estatístico. A teoria sugere que se deve ter um mínimo de 5 observações em cada casela da tabela de contingência entre as duas variáveis. Sendo assim, se não for obtido esse valor mínimo, as conclusões do teste não serão precisas. Os dois testes fornecem um p -valor que permite que seja rejeitada ou não a hipótese nula. Nesse estudo trabalhou-se com teste de hipótese com nível de confiança de 0,05. Sendo assim, se p -valor < 0,05, rejeitou-se a hipótese nula, ou seja, assumiu-se a interpretação de que há evidências que as variáveis não são independentes (existe a influência de uma no comportamento da outra). Para a realização das análises foi utilizado o software livre *R version 3.6.1*. O software pode ser obtido no site <https://cran.r-project.org/bin/windows/base/>.

Além disso, ressalta-se que todos os resultados obtidos derivam da análise bivariada entre o “uso de agrotóxico” e “aparência de um determinado sintoma” para cada grupo

de genótipo. Sendo assim, todos os agricultores (teste: agricultores que utilizam agrotóxicos e controle: agricultores que não utilizam agrotóxicos) de cada grupo de genótipo estão incluídos nas análises. O objetivo final é verificar se existe associação entre o “uso de agrotóxico” e a “aparência de um determinado sintoma” para agricultores de acordo com os grupos de genótipos (A, B e C). Em relação à avaliação da variável referente à quantidade de sintomas, foram criadas classes de mesma amplitude e foi utilizada a metodologia descrita por Morettin e Bussab (2010).

A frequência alélica e genotípica dos genes investigados foi determinada por contagem direta dos alelos. O teste exato de Fisher, no formato de Fisher-Freeman-Halton (FREEMAN *et al.*, 1951), foi usado para comparação da distribuição dos alelos e dos genótipos *CYP2C9* da população estudada nos diferentes subgrupos e para comparação com frequências já descritas em outras populações. Os intervalos de confiança (95%) para os percentuais de frequências foram calculados pela estimativa da probabilidade de parâmetros multinomiais. O teste Qui-quadrado de Pearson (X^2) de aderência foi usado para comparar as frequências observadas e as esperadas pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE).

6 RESULTADOS

Este trabalho procurou encontrar possíveis associações entre o uso diário de agrotóxicos e o surgimento de diversos sintomas e doenças em lavradores do sul do Espírito Santo, além de avaliar a possível associação da presença dos sintomas/doenças com a presença de polimorfismos no gene *CYP2C9*, que codifica a enzima hepática CYP2C9, uma das responsáveis pelo metabolismo de substâncias endógenas e xenobióticos. Para estudar a referida associação, foi aplicado um questionário (ANEXO I) para cada agricultor contendo uma lista de 43 sintomas/doenças que os mesmos poderiam apresentar, e foram analisadas 304 amostras de DNA dos referidos trabalhadores.

Nesse conjunto amostral foram pesquisadas duas variantes polimórficas do gene *CYP2C9* (*2 e *3), sendo que ambas as variantes ocorrem em regiões codificantes do gene (éxons) e conferem uma atividade reduzida para as isoformas da referida enzima.

Os genótipos dos agricultores desse estudo foram divididos em homozigotos e heterozigotos variantes (*1/*2, *1/*3, *2/*2, *2/*3, *3/*3), além do genótipo selvagem *1/*1, o qual não possui nenhuma das duas alterações investigadas (*2 ou *3). Foram calculadas as frequência alélicas e genotípicas na população estudada, conforme pode ser observado nas Tabelas 2 e 3.

A Tabela 2 apresenta a frequência de cada genótipo. Observamos que o genótipo mais frequente é o *1/*1 (0,645), seguido do *1/*2 (0,224) e do *1/*3 (0,092). Os genótipos *2/*2 e *2/*3 apresentaram a mesma frequência (0,016) e o genótipo *3/*3 foi o de menor ocorrência (0,007).

Tabela 2 - Frequência dos genótipos na população estudada (N=304)

Genótipos	n	Frequência
*1/*1	196	0,645
*1/*2	68	0,224
*1/*3	28	0,092
*2/*2	5	0,016
*2/*3	5	0,016
*3/*3	2	0,007

N: número total de indivíduos; n: subtotal de amostras; Frequência=n/N

A Tabela 3 apresenta a frequência de cada alelo do gene *CYP2C9* (*1, *2 e *3). O alelo *1 (N=488) apresentou a maior frequência dentre os alelos analisados (0,803), seguido do alelo *2 (N=83) que apresenta frequência muito inferior (0,137) e o alelo *3 (N=37) que apresentou a menor frequência dos três (0,061).

Tabela 3 - Frequência alélica na população estudada (N=608)

Alelo	n	Frequência
*1	488	0,803
*2	83	0,137
*3	37	0,061

N: número total de indivíduos; n: subtotal de amostras; Frequência=n/N

As frequências alélicas e genótípicas foram utilizadas para análise de adesão ao equilíbrio de *Hardy-Weinberg*. Foi observado com base na frequência dos genótipos para *CYP2C9*, que o teste X^2 apresentou um p -valor superior a 0.05, logo, podemos afirmar que a população deste estudo está em equilíbrio de *Hardy-Weinberg*.

Todos os resultados obtidos a seguir derivam da análise bivariada entre o uso de agrotóxico e aparição de um determinado sintoma para cada grupo de genótipo. Sendo assim, todos os agricultores (teste: agricultores que utilizam agrotóxicos e controle: agricultores que NÃO utilizam agrotóxicos) de cada grupo de genótipo estão incluídos nas análises. O objetivo final é saber se existe associação entre o uso de agrotóxicos e a aparição de um determinado sintoma em agricultores de acordo com o genótipo que possuem (A, B e C).

Para a análise de associação, os genótipos foram separados por atividade de metabolização da seguinte maneira:

- Indivíduos *1/*1: METABOLIZADORES “NORMAIS” (CONTROLE): “A”
- Indivíduos *1/*2; *1/*3: METABOLIZADORES INTERMEDIÁRIOS: “B”
- Indivíduos *2/*2; *2/*3; *3/*3: METABOLIZADORES LENTOS: “C”

Pela Tabela 4, podemos observar que a maioria, ou seja, 72,01% dos trabalhadores entrevistados são do gênero masculino e 27,99% são do gênero feminino.

Tabela 4 - Gênero dos trabalhadores rurais

Gênero	Feminino		Masculino		Total
	Freq. Absoluta	Freq. Relativa (%)	Freq. Absoluta	Freq. Relativa (%)	
	75	27,99	193	72,01	268

As Tabelas 5 e 6 representam a idade média em relação ao tempo de trabalho (em anos) como agricultor rural, envolvendo tanto os trabalhadores que usam agrotóxicos quanto os que não usam agrotóxicos.

De acordo com as Tabelas 5 e 6 (que representam o número total de indivíduos e o percentual relativo dos mesmos, respectivamente), observamos que existe uma concentração de agricultores com idade entre 34 a 50 anos e com tempo de trabalho como agricultor de 26 a 50 anos, com número total de indivíduos nesta intersecção de 86, que representa 32,21% do total de agricultores.

Tabela 5 - Distribuição do tempo de ocupação (em anos) em relação à faixa etária na população de estudo

Faixa etária	Tempo de ocupação (em anos)			
	1 a 25	26 a 50	51 a 75	76 a 100
18 a 33	49	12	5	6
34 a 50	29	86	7	9
51 a 67	10	30	12	10
68 a 84	0	0	1	1

Tabela 6 - Distribuição do tempo de ocupação (em anos) em relação à faixa etária na população de estudo em percentual (%)

Idade	Tempo agricultor (em anos)				Total
	1 a 25	26 a 50	51 a 75	76 a 100	
18 a 33	18,35%	4,49%	1,87%	2,25%	26,97%
34 a 50	10,86%	32,21%	2,62%	3,37%	49,06%
51 a 67	3,75%	11,24%	4,49%	3,75%	23,22%
68 a 84	0,00%	0,00%	0,37%	0,37%	0,75%
Total	32,96%	47,94%	9,36%	9,74%	100%

A primeira análise foi feita com relação à quantidade de sintomas apresentados pelos agricultores, comparando os trabalhadores que usam agrotóxicos e os que não usam agrotóxicos.

Tabela 7 - Quantidade de Sintomas Apresentados pelos Agricultores

Classe genótipo	Uso de agrotóxico	Número Sintomas
A	SIM	1974
	NÃO	190
B	SIM	955
	NÃO	97
C	SIM	141
	NÃO	14

Na tabela acima (tabela 7) temos a informação de como se comportou a quantidade de sintomas dos agricultores quando separamos os mesmos por classe de genótipo e uso de agrotóxico. A partir desta análise podemos ter a impressão de um certo indício de que agricultores expostos a agrotóxicos apresentam uma quantidade maior de sintomas, porém ocorre pois o número de agricultores que trabalham com agrotóxicos é muito maior do que número de agricultores que não trabalham com agrotóxicos (número absoluto).

Essa informação pode ser melhor verificada na Tabela 9, em que observamos a frequência de uso do total de agrotóxicos na população estudada: cerca de 90,27% dos agricultores utilizam agrotóxicos e apenas 9,03% não utilizam agrotóxicos.

Tabela 8 - Quantidade de trabalhadores rurais que utilizam agrotóxicos

Usa agrotóxico	Usam agrotóxicos		Não usam agrotóxicos		Total
	Freq. Absoluta	Freq. Relativa (%)	Freq. Absoluta	Freq. Relativa (%)	
	272	90,97	27	9,03	

Em seguida, na tabela 9, temos a frequência do uso de cada tipo de agrotóxico, disso temos que os agrotóxicos mais utilizados são o glifosato (79,66%), o flutriafol

(32,85%), o tiametoxam (26,91%) e o ciproconazol (22,34%). Esses são os agrotóxicos que mais de 20% dos produtores rurais afirmam utilizar. Além disso, temos os agrotóxicos que são utilizados por poucos produtores rurais.

Essas percentagens são observadas visto que os agricultores utilizam mais de um tipo de agrotóxico concomitantemente.

Tabela 9 - Frequência de uso dos agrotóxicos

Tipo de Agrotóxico	Usam Agrotóxicos		Não usam agrotóxicos		Total
	Freq. Absoluta	Freq. Relativa (%)	Freq. Absoluta	Freq. Relativa (%)	
Glifosato	23	79,66	59	20,34	290
Ciproconazoltriadimenol	61	22,34	212	77,66	273
Mancozebe	5	1,83	268	98,17	273
Tebuconazol	1	0,37	272	99,63	273
Azoxistrobina	18	6,59	255	93,41	273
Usaciproconazol	39	14,23	235	85,77	274
Flutriafofianometicul o	6	2,20	267	97,80	273
Usaflutriafol	90	32,85	184	67,15	274
Azoxistrobinaciproconaz ol	18	6,59	255	93,41	273
Oxicloreto de cobre	8	2,93	265	97,07	273
Fenpropatrina	7	2,56	266	97,44	273
Abamectina	5	1,82	269	98,18	274
Fosfeto de alumínio	6	2,20	267	97,80	273
Imiracloprido	18	6,59	255	93,41	273
Lambdacialotrina	4	1,47	269	98,53	273
Tiametoxam	74	26,91	201	73,09	275
Oxifluorfem	4	1,48	266	98,52	270
2,4 – D-dimetilamina	21	7,72	251	92,28	272

A seguir, na tabela 10, vamos observar como se comporta a média da quantidade de sintomas de acordo com a classe de metabolizadores (A, B e C).

Tabela 10 - Média de Sintomas Apresentados pelos Agricultores

Classe genótipo	Uso de agrotóxico	Média do Número Sintomas
A	SIM	11,41
A	NÃO	11,17
B	SIM	11,36
B	NÃO	12,125
C	SIM	12,82
C	NÃO	14

Interessantemente, quando observamos a média de quantos sintomas cada uma dessas classes de agricultores apresentaram (tabela 10), notamos valores muito parecidos para todos eles (sendo que esses dados também estão de acordo com o que foi descrito na tabela 7). Logo, concluímos com essas análises que, em relação à média do número de sintomas apresentados pelos agricultores de acordo com sua classe respectiva de genótipos, não existe diferença entre aqueles agricultores que usam agrotóxicos quando comparado aos que não usam agrotóxicos.

Dada essa análise inicial, vamos observar como se comportam algumas variáveis comportamentais como o consumo de bebidas alcoólicas e uso de tabaco para as diferentes classes de genótipos (tabela 11).

Tabela 11 – Uso Bebida alcoólica / Tabaco

Classe Genótipo	Bebida alcoólica			Total
	Bebe atualmente	Já bebeu e não bebe atualmente	Nunca bebeu	
A	79 (42,24%)	43 (22,99%)	65 (34,77%)	187 (100%)
B	44 (47,31%)	22 (23,65%)	27 (29,04%)	93 (100%)
C	5 (41,67%)	2 (16,66%)	5 (41,67%)	12 (100%)
Classe Genótipo	Uso de tabaco			Total
	Fuma atualmente	Já fumou e não fuma atualmente	Nunca fumou	
A	15 (8,02%)	37 (21,51%)	135 (70,47%)	135 (100%)
B	7 (7,61%)	13 (15,29%)	72 (77,10%)	72 (100%)
C	1 (8,33%)	2 (18,18%)	9 (75,01%)	9 (100%)

Podemos observar na tabela 11 que não há evidências de que o genótipo tenha alguma associação com os hábitos dos agricultores, uma vez que esses hábitos apresentam distribuição muito similar para cada um dos genótipos.

Voltando às análises com relação aos sintomas apresentados pelos agricultores, vamos observar o fato de os agricultores apresentarem (ou não) sintomas de acordo com a classe de genótipo (tabela 12).

Tabela 12 - Classe de genótipos / Presença de Sintomas

Classe genótipo	Apresentou sintomas		Total
	Sim	Não	
A	185 (96,86%)	6 (3,14%)	191 (100%)
B	90 (94,74%)	5 (5,26%)	95 (100%)
C	12 (100%)	0 (0,00%)	12 (100%)

Ao observarmos a tabela acima (tabela 13) podemos constatar que há evidências de que a apresentação de sintomas não está associada com a classe de genótipo do agricultor, uma vez que as colunas “Sim” e “Não” se distribuem de maneira praticamente igual para as 3 classes de genótipos. Sendo assim surge a necessidade de voltarmos a analisar o uso de agrotóxico (tabela 13):

Tabela 13 – Uso de Agrotóxicos / Presença de Sintomas

Agrotóxico	Apresentou sintomas		Total
	Sim	Não	
Sim	258 (96,27%)	10 (3,73%)	268 (100%)
Não	25 (96,15%)	1 (3,85%)	26 (100%)

E ao observarmos o resultado dessa análise (tabela 13), reforçamos o resultado que encontramos anteriormente. Apresentar (ou não) sintomas se comporta de maneira similar para agricultores que se expõe ou não se expõe aos agrotóxicos. Podemos observar também como a quantidade de sintomas se comporta se verificarmos o gráfico de barras a seguir (figura 7):

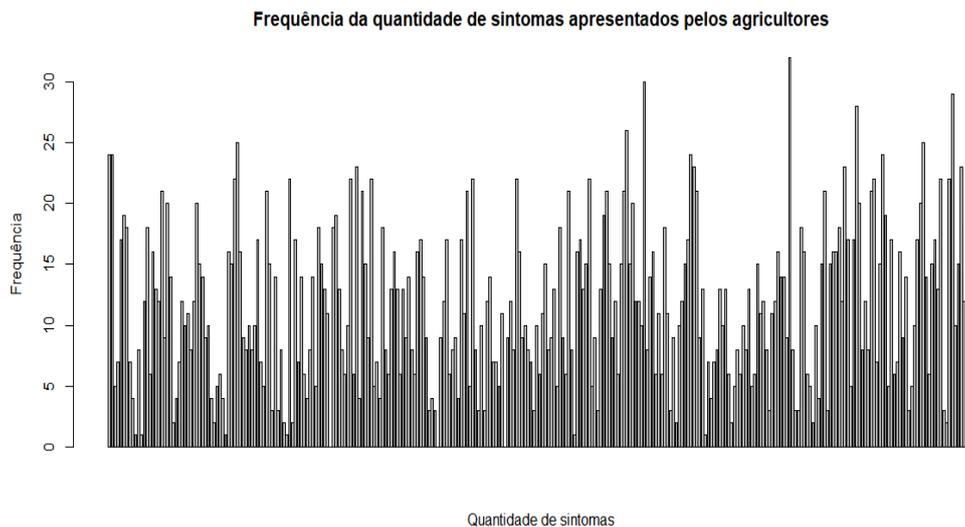


Figura 7 Frequência da quantidade de sintomas apresentados pelos agricultores.
Fonte: Próprio autor, 2020.

Nesta figura, observamos uma barra para a quantidade de sintomas apresentados por cada agricultor e vemos que não há um padrão de quantidade que mais se repita (figura 7).

A partir dessas análises realizamos uma classificação dessa quantidade de sintomas da seguinte forma: até 10 sintomas recebeu a denominação 'I'; entre 10 e 20 sintomas recebeu a denominação 'II'; e acima de 20 sintomas recebeu a denominação 'III'. Para realizar a avaliação da variável referente à quantidade de sintomas, criamos classes de mesma amplitude e utilizamos a metodologia descrita por Morettin e Bussab (2010).

Sendo assim temos a seguinte distribuição dessas denominações (tabela 14):

Tabela 14 - Distribuição do número indivíduos por grupo de sintomas

I	II	III
149	114	35

Fizemos essa classificação no intuito de observarmos se a quantidade de sintomas apresentados pelos agricultores possui associação com o uso de agrotóxico. Portanto, vamos observar a tabela de frequência (tabela 15):

Tabela 15 - Quantidade de sintomas / Uso de agrotóxicos

Genótipo A				p-valor (Qui- quadrado)	p-valor (Fisher)
Agrotóxico	Quantidade de sintomas			0,7443	0,6768
	I	II	III		
Sim	89	63	21	0,7443	0,6768
Não	9	5	3		
Genótipo B					
Agrotóxico	Quantidade de sintomas			0,389	0,5481
	I	II	III		
Sim	41	34	9	0,389	0,5481
Não	3	5	0		
Genótipo C					
Agrotóxico	Quantidade de sintomas			0,466	1
	I	II	III		
Sim	5	4	2	0,466	1
Não	0	1	0		

Para testarmos a independência das variáveis foram utilizados os testes qui-quadrado e o teste exato de Fisher.

Observamos por meio do p -valor de ambos os testes que não temos evidências para

rejeitar a hipótese nula de que as variáveis são independentes. Dessa maneira concluímos que a quantidade total de sintomas apresentados pelos agricultores não possui associação com o uso ou não de agrotóxicos.

Feita essa análise, vamos nos voltar para a pergunta fundamental do projeto: “existe associação entre o uso dos agrotóxicos e o aparecimento de sintomas específicos de acordo com os genótipos analisados comparativamente?”

Portanto, para responder tal pergunta teríamos que observar a frequência do uso de agrotóxico e a apresentação de todos os 43 sintomas para cada uma das classes de genótipo. Basicamente, foram construídas 3 tabelas de frequência para cada sintoma/doença de acordo com o genótipo e uso (ou não) de agrotóxicos. Após a construção das tabelas de frequência foram utilizados os teste qui-quadrado e teste exato de Fisher para testar a hipótese nula de que as variáveis são independentes a um nível de significância de 0,05.

Resumidamente, os resultados apresentados foram interpretados da seguinte forma: Se o p -valor do teste for menor que seu nível de significância nós rejeitamos a hipótese nula, caso o contrário, não temos evidências para rejeitar a hipótese nula e, portanto, consideramos as variáveis como sendo independentes.

Abaixo segue a análise para o sintoma “Irritação ocular”:

Tabela 16 - Análise para o sintoma “Irritação ocular”

Genótipo A				
Agrotóxico	Irritação ocular		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	89	84	0,9275	0,8025
Não	8	9		
Genótipo B				
Agrotóxico	Irritação ocular		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	52	32	0,7264	0,7054
Não	6	2		
Genótipo C				
Agrotóxico	Irritação ocular		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	5	6	1	1
Não	0	1		

Portanto não rejeitamos a hipótese nula de independência a um nível de confiança de 95%. Ou seja, o uso de agrotóxico não tem associação com o aparecimento de irritação ocular para pessoas do genótipo A, B e C.

Segue a análise para o sintoma “Lesões na pele e alergias”:

Tabela 17 - Análise para o sintoma “Lesões na pele e alergias”

Genótipo A				
Agrotóxico	Lesões na pele e alergias		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	61	112	0,2385	0,1887
Não	9	8		
Genótipo B				
Agrotóxico	Lesões na pele e alergias		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	28	55	0,9139	1
Não	6	2		
Genótipo C				
Agrotóxico	Lesões na pele e alergias		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	6	5	1	1
Não	0	1		

Portanto não rejeitamos a hipótese nula de independência a um nível de confiança de 95%. Ou seja, o uso de agrotóxico não tem associação com o aparecimento de lesões na pele e alergia para pessoas do genótipo A, B e C.

Segue a análise para o sintoma “Queimaduras na pele”:

Tabela 18 - Análise para o sintoma “Queimaduras na pele”

Genótipo A				
Agrotóxico	Queimaduras na pele		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	28	144	0,8902	1
Não	2	15		
Genótipo B				
Agrotóxico	Queimaduras na pele		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	18	66	1	1
Não	2	6		
Genótipo C				
Agrotóxico	Queimaduras na pele		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	2	9	0,5465	0,25
Não	1	0		

Portanto não rejeitamos a hipótese nula de independência a um nível de confiança de 95%. Ou seja, o uso de agrotóxico não tem associação com o aparecimento queimaduras na pele para pessoas do genótipo A, B e C.

Segue a análise para o sintoma “Náusea e ânsia de vômito”:

Tabela 19 - Análise para o sintoma “Náusea e ânsia de vômito”

Genótipo A				
Agrotóxico	Náusea e ânsia de vômito		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	73	100	0,7694	0,6184
Não	6	11		
Genótipo B				
Agrotóxico	Náusea e ânsia de vômito		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	34	50	0,1313	0,0740
Não	6	2		
Genótipo C				
Agrotóxico	Náusea e ânsia de vômito		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	5	6	1	1
Não	1			

Portanto não rejeitamos a hipótese nula de independência a um nível de 0,05. Ou seja, o uso de agrotóxico não tem associação com o aparecimento de Náusea e ânsia de vômito para pessoas do genótipo A, B e C.

Segue a análise para o sintoma “Catarro”:

Tabela 20 - Análise para o sintoma “Catarro”

Genótipo A				
Agrotóxico	Catarro		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	67	106	0,6216	0,6024
Não	5	12		
Genótipo B				
Agrotóxico	Catarro		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	33	51	0,8311	0,7096
Não	4	4		
Genótipo C				
Agrotóxico	Catarro		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	6	5	1	1
Não	1	0		

Portanto não rejeitamos a hipótese nula de independência. Ou seja, o uso de agrotóxico não tem associação com o aparecimento de Catarro para pessoas do genótipo A, B e C.

Segue a análise para o sintoma “Dor abdominal”:

Tabela 21 - Análise para o sintoma “Dor abdominal”

Genótipo A				
Agrotóxico	Dor abdominal		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	69	104	1	1
Não	7	10		
Genótipo B				
Agrotóxico	Dor abdominal		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	40	44	1	1
Não	4	4		
Genótipo C				
Agrotóxico	Dor abdominal		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	5	6	1	1
Não	1	0		

Portanto não rejeitamos a hipótese nula de independência. Ou seja, o uso de agrotóxico não tem associação com o aparecimento de dor abdominal para pessoas do genótipo A, B e C.

Segue a análise para o sintoma “Diarreia”:

Tabela 22 - Análise para o sintoma “Diarreia”

Genótipo A				
Agrotóxico	Diarreia		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	71	102	1	1
Não	7	10		
Genótipo B				
Agrotóxico	Diarreia		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	32	52	0,2907	0,2509
Não	1	7		
Genótipo C				
Agrotóxico	Diarreia		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	3	8	1	1
Não	0	1		

Portanto não rejeitamos a hipótese nula de independência. Ou seja, o uso de agrotóxico não tem associação com o aparecimento de diarreia para pessoas do genótipo A, B e C.

Segue a análise para o sintoma “Digestão difícil”:

Tabela 23 - Análise para o sintoma “Digestão difícil”

Genótipo A				
Agrotóxico	Digestão difícil		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	57	116	1	1
Não	6	11		
Genótipo B				
Agrotóxico	Digestão difícil		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	26	58	0,4909	0,429
Não	1	7		
Genótipo C				
Agrotóxico	Digestão difícil		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	5	6	1	1
Não	0	1		

Portanto não rejeitamos a hipótese nula de independência. Ou seja, o uso de agrotóxico não tem associação com o aparecimento de irritação ocular para pessoas do genótipo A, B e C.

Segue a análise para o sintoma “Chiados/sibilos”:

Tabela 24 - Análise para o sintoma “Chiados/sibilos”

Genótipo A				
Agrotóxico	Chiados/sibilos		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	27	146	1	0,7356
Não	3	14		
Genótipo B				
Agrotóxico	Chiados/sibilos		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	14	70	0,4599	0,6026
Não	0	8		
Genótipo C				
Agrotóxico	Chiados/sibilos		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	2	9	1	1
Não	0	1		

Portanto não rejeitamos a hipótese nula de independência. Ou seja, o uso de agrotóxico não tem associação com o aparecimento de “chiados/sibilos” para pessoas do genótipo A, B e C.

Segue análise para o sintoma “asma”:

Tabela 25 - Análise para o sintoma “Asma”

Genótipo A				
Agrotóxico	Asma		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	15	158	0,1272	0,07319
Não	4	13		
Genótipo B				
Agrotóxico	Asma		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	9	75	0,7249	1
Não	0	8		
Genótipo C				
Agrotóxico	Asma		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	2	9	1	1
Não	0	1		

Portanto não rejeitamos a hipótese nula de independência a um nível de significância de 0,05. Ou seja, o uso de agrotóxico não tem associação com o aparecimento de asma para pessoas do genótipo A, B e C.

Segue a análise para o sintoma “Inflamações gástricas”:

Tabela 26 - Análise para o sintoma “Inflamações gástricas”

Genótipo A				
Agrotóxico	Inflamações gástricas		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	38	135	0,6918	0,5439
Não	5	12		
Genótipo B				
Agrotóxico	Inflamações gástricas		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	30	54	0,3493	0,2589
Não	1	7		
Genótipo C				
Agrotóxico	Inflamações gástricas		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	2	9	1	1
Não	0	1		

Portanto não rejeitamos a hipótese nula de independência. Ou seja, o uso de agrotóxico não tem associação com o aparecimento de inflamações gástricas para pessoas do genótipo A, B e C.

Segue a análise para o sintoma “Doenças hepáticas”:

Tabela 27 - Análise para o sintoma “Doenças hepáticas”

Genótipo A				
Agrotóxico	Doenças hepáticas		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	19	154	0,8105	1
Não	1	16		
Genótipo B				
Agrotóxico	Doenças hepáticas		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	9	75	0,7249	1
Não	0	8		
Genótipo C				
Agrotóxico	Doenças hepáticas		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	4	7	1	1
Não	0	1		

Portanto não rejeitamos a hipótese nula de independência. Ou seja, o uso de agrotóxico não tem associação com o aparecimento de Doenças hepáticas para pessoas do genótipo A, B e C.

Segue a análise para o sintoma “Alterações na pressão arterial”:

Tabela 28 - Análise para o sintoma “Alterações na pressão arterial”

Genótipo A				
Agrotóxico	Alterações na pressão arterial		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	40	133	0,003717	0,003055
Não	10	7		
Genótipo B				
Agrotóxico	Alterações na pressão arterial		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	25	59	1	1
Não	2	6		
Genótipo C				
Agrotóxico	Alterações na pressão arterial		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	2	9	0,5465	0,25
Não	1	0		

Portanto não rejeitamos a hipótese nula de independência para pessoas com o genótipo B e C. Já para pessoas do genótipo A temos evidências para rejeitar a hipótese de que “Alterações na pressão arterial” é independente do uso de agrotóxico.

Segue a análise para o sintoma “Infertilidade”:

Tabela 29 - Análise para o sintoma “Infertilidade”

Genótipo A				
Agrotóxico	Infertilidade		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	3	168	1	1
Não	0	17		
Genótipo B				
Agrotóxico	Infertilidade		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	0	83	0,1434	0,08791
Não	1	7		
Genótipo C				
Agrotóxico	Infertilidade		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	1	10	1	1
Não	0	1		

Portanto não rejeitamos a hipótese nula de independência. Ou seja, o uso de agrotóxico não tem associação com o aparecimento de infertilidade para pessoas do genótipo A, B e C.

Segue a análise para o sintoma “Lacrimejamento:

Tabela 30 - Análise para o sintoma “Lacrimejamento”

Genótipo A				
Agrotóxico	Lacrimejamento		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	42	131	0,753	0,7663
Não	3	14		
Genótipo B				
Agrotóxico	Lacrimejamento		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	21	63	0,27	0,2061
Não	4	4		
Genótipo C				
Agrotóxico	Lacrimejamento		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	3	8	1	1
Não	0	1		

Portanto não rejeitamos a hipótese nula de independência. Ou seja, o uso de agrotóxico não tem associação com o aparecimento de lacrimejamento para pessoas do genótipo A, B e C.

Segue análise para o sintoma “Tonturas”:

Tabela 31 - Análise para o sintoma “Tonturas”

Genótipo A				
Agrotóxico	Tonturas		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	84	88	1	1
Não	8	9		
Genótipo B				
Agrotóxico	Tonturas		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	39	45	0,91	0,7231
Não	3	5		
Genótipo C				
Agrotóxico	Tonturas		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	6	5	1	1
Não	0	1		

Portanto não rejeitamos a hipótese nula de independência. Ou seja, o uso de agrotóxico não tem associação com o aparecimento de tonturas para pessoas do genótipo A, B e C.

Segue a análise para o sintoma “Tosse”:

Tabela 32 - Análise para o sintoma “Tosse”

Genótipo A				
Agrotóxico	Tosse		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	73	100	0,2161	0,1954
Não	4	13		
Genótipo B				
Agrotóxico	Tosse		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	39	45	0,91	0,7231
Não	3	5		
Genótipo C				
Agrotóxico	Tosse		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	6	5	1	1
Não	1	0		

Portanto não rejeitamos a hipótese nula de independência. Ou seja, o uso de agrotóxico não tem associação com o aparecimento de tosse para pessoas do genótipo A, B e C.

Segue a análise para o sintoma “Falta de ar”:

Tabela 33 - Análise para o sintoma “Falta de ar”

Genótipo A				
Agrotóxico	Falta de ar		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	46	127	0,3191	0,2558
Não	7	10		
Genótipo B				
Agrotóxico	Falta de ar		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	22	62	1	1
Não	2	6		
Genótipo C				
Agrotóxico	Falta de ar		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	3	8	0,7119	0,3333
Não	1	0		

Portanto não rejeitamos a hipótese nula de independência. Ou seja, o uso de agrotóxico não tem associação com o aparecimento de falta de ar para pessoas do genótipo A, B e C.

Segue a análise para o sintoma “Visão turva”:

Tabela 34 - Análise para o sintoma “Visão turva”

Genótipo A				
Agrotóxico	Visão turva		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	60	113	0,8656	0,7922
Não	5	12		
Genótipo B				
Agrotóxico	Visão turva		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	28	56	0,5773	0,4422
Não	4	4		
Genótipo C				
Agrotóxico	Visão turva		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	4	7	1	1
Não	0	1		

Portanto não rejeitamos a hipótese nula de independência. Ou seja, o uso de agrotóxico não tem associação com o aparecimento de visão turva para pessoas do genótipo A, B e C.

Segue análise para o sintoma “Tremores”:

Tabela 35 - Análise para o sintoma “Tremores”

Genótipo A				
Agrotóxico	Tremores		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	44	129	0,2666	0,1642
Não	7	10		
Genótipo B				
Agrotóxico	Tremores		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	27	57	0,4522	0,4272
Não	1	7		
Genótipo C				
Agrotóxico	Tremores		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	3	8	0,7119	0,3333
Não	1	0		

Portanto não rejeitamos a hipótese nula de independência. Ou seja, o uso de agrotóxico não tem associação com o aparecimento de tremores para pessoas do genótipo A, B e C.

Segue a análise para o sintoma “Vômitos”:

Tabela 36 - Análise para o sintoma “Vômitos”

Genótipo A				
Agrotóxico	Vômitos		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	64	109	0,4009	0,3044
Não	4	13		
Genótipo B				
Agrotóxico	Vômitos		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	29	55	0,8783	0,7127
Não	2	6		
Genótipo C				
Agrotóxico	Vômitos		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	3	8	0,7119	0,3333
Não	1	0		

Portanto não rejeitamos a hipótese nula de independência. Ou seja, o uso de agrotóxico não tem associação com o aparecimento de vômitos para pessoas do genótipo A, B e C.

Segue a análise para o sintoma “Dor nas articulações”:

Tabela 37 - Análise para o sintoma “Dor nas articulações”

Genótipo A				
Agrotóxico	Dor nas articulações		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	85	88	1	1
Não	8	9		
Genótipo B				
Agrotóxico	Dor nas articulações		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	42	42	0,7598	0,7145
Não	3	5		
Genótipo C				
Agrotóxico	Dor nas articulações		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	5	6	1	1
Não	1	0		

Portanto não rejeitamos a hipótese nula de independência. Ou seja, o uso de agrotóxico não tem associação com o aparecimento de dor nas articulações para pessoas do genótipo A, B e C.

Segue a análise para o sintoma “Hepatite”:

Tabela 38 - Análise para o sintoma “Hepatite”

Genótipo A				
Agrotóxico	Hepatite		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	16	157	1	0,6665
Não	2	15		
Genótipo B				
Agrotóxico	Hepatite		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	8	76	0,07838	0,05176
Não	3	5		
Genótipo C				
Agrotóxico	Hepatite		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	0	11	0,003892	-
Não	0	1		

Portanto não rejeitamos a hipótese nula de independência. O resultado apresentado pelo teste qui-quadrado não traz significância estatística devido ao baixo número de observações. Ou seja, o uso de agrotóxico não tem associação com o aparecimento de hepatite para pessoas do genótipo A, B e C.

Segue a análise para o sintoma “Artrose/osteoporose”:

Tabela 39 - Análise para o sintoma “Artrose/osteoporose”

Genótipo A				
Agrotóxico	Artrose/osteoporose		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	17	156	0,9236	1
Não	1	16		
Genótipo B				
Agrotóxico	Artrose/osteoporose		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	5	78	1	1
Não	0	8		
Genótipo C				
Agrotóxico	Artrose/osteoporose		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	1	10	1	1
Não	0	1		

Portanto não rejeitamos a hipótese nula de independência. Ou seja, o uso de agrotóxico não tem associação com o aparecimento de artrose/osteoporose para pessoas do genótipo A, B e C.

Segue a análise para o sintoma “Doenças renais”:

Tabela 40 - Análise para o sintoma “Doenças renais”

Genótipo A				
Agrotóxico	Doenças renais		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	38	135	0,06536	0,02635
Não	0	17		
Genótipo B				
Agrotóxico	Doenças renais		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	22	62	0,6692	0,6742
Não	1	7		
Genótipo C				
Agrotóxico	Doenças renais		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	2	9	1	1
Não	0	1		

Portanto não rejeitamos a hipótese nula de independência para pessoas do genótipo B e C. No entanto, temos evidências para rejeitar a hipótese nula de independência entre o aparecimento de doenças renais e uso de agrotóxico para pessoas com o genótipo A.

Segue a análise para o sintoma “Doenças respiratórias”:

Tabela 41 - Análise para o sintoma “Doenças respiratórias”

Genótipo A				
Agrotóxico	Doenças respiratórias		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	23	150	0,8978	0,709
Não	3	14		
Genótipo B				
Agrotóxico	Doenças respiratórias		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	14	70	1	1
Não	1	7		
Genótipo C				
Agrotóxico	Doenças respiratórias		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	1	10	1	1
Não	0	1		

Portanto não rejeitamos a hipótese nula de independência. Ou seja, o uso de agrotóxico não tem associação com o aparecimento de doenças respiratórias para pessoas do genótipo A, B e C.

Segue análise para o sintoma “Déficit de atenção”:

Tabela 42 - Análise para o sintoma “Déficit de atenção”

Genótipo A				
Agrotóxico	Déficit de atenção		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	15	157	0,4455	0,2099
Não	3	14		
Genótipo B				
Agrotóxico	Déficit de atenção		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	5	79	0,01782	0,020081
Não	3	5		
Genótipo C				
Agrotóxico	Déficit de atenção		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	2	9	1	1
Não	0	1		

Portanto não rejeitamos a hipótese nula de independência para pessoas do genótipo A e C. No entanto, temos evidências para rejeitar a hipótese nula de independência entre o aparecimento de déficit de atenção e o uso de agrotóxico para pessoas do genótipo B.

Segue a análise para o sintoma “Abortamentos”:

Tabela 43 - Análise para o sintoma “Abortamentos”

Genótipo A				
Agrotóxico	Abortamentos		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	10	163	1	1
Não	1	16		
Genótipo B				
Agrotóxico	Abortamentos		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	2	82	0,0007	0,00409
Não	3	5		
Genótipo C				
Agrotóxico	Abortamentos		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	1	10	1	1
Não	0	1		

Portanto não rejeitamos a hipótese nula de independência para pessoas do genótipo A e C. No entanto, temos evidências para rejeitar a hipótese nula de independência entre abortamentos e o uso de agrotóxico para pessoas do genótipo B.

Segue a análise para o sintoma “Dor de cabeça”:

Tabela 44 - Análise para o sintoma “Dor de cabeça”

Genótipo A				
Agrotóxico	Dor de cabeça		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	114	59	0,4233	0,2981
Não	9	8		
Genótipo B				
Agrotóxico	Dor de cabeça		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	54	30	0,2981	0,4615
Não	4	4		
Genótipo C				
Agrotóxico	Dor de cabeça		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	7	4	1	1
Não	1	0		

Portanto não rejeitamos a hipótese nula de independência. Ou seja, o uso de agrotóxico não tem associação com o aparecimento de dor de cabeça para pessoas do genótipo A, B e C.

Segue análise para o sintoma “Suor excessivo”:

Tabela 45 - Análise para o sintoma “Suor excessivo”

Genótipo A				
Agrotóxico	Suor excessivo		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	65	108	0,3764	0,3005
Não	4	13		
Genótipo B				
Agrotóxico	Suor excessivo		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	28	56	1	1
Não	3	5		
Genótipo C				
Agrotóxico	Suor excessivo		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	7	4	0,8599	0,4167
Não	0	1		

Portanto não rejeitamos a hipótese nula de independência. Ou seja, o uso de agrotóxico não tem associação com o aparecimento de suor excessivo para pessoas do genótipo A, B e C.

Segue a análise para o sintoma “Salivação”:

Tabela 46 - Análise para o sintoma “Salivação”

Genótipo A				
Agrotóxico	Salivação		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	30	143	0,8052	0,7422
Não	2	15		
Genótipo B				
Agrotóxico	Salivação		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	7	77	0,8794	1
Não	0	8		
Genótipo C				
Agrotóxico	Salivação		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	3	8	1	1
Não	0	1		

Portanto não rejeitamos a hipótese nula de independência. Ou seja, o uso de agrotóxico não tem associação com o aparecimento de salivação para pessoas do genótipo A, B e C.

Segue a análise para o sintoma “Agitação/irritabilidade”:

Tabela 47 - Análise para o sintoma “Agitação/irritabilidade”

Genótipo A				
Agrotóxico	Agitação/irritabilidade		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	70	103	0,8763	0,7981
Não	6	11		
Genótipo B				
Agrotóxico	Agitação/irritabilidade		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	26	58	0,1578	0,1136
Não	5	3		
Genótipo C				
Agrotóxico	Agitação/irritabilidade		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	3	8	0,7119	0,3333
Não	1	0		

Portanto não rejeitamos a hipótese nula de independência. Ou seja, o uso de agrotóxico não tem associação com o aparecimento de agitação/irritabilidade para pessoas do genótipo A, B e C.

Segue a análise para o sintoma “Formigamento”:

Tabela 48 - Análise para o sintoma “Formigamento”

Genótipo A				
Agrotóxico	Formigamento		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	82	91	0,2439	0,2043
Não	5	12		
Genótipo B				
Agrotóxico	Formigamento		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	33	51	0,2642	0,2501
Não	1	7		
Genótipo C				
Agrotóxico	Formigamento		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	5	6	1	1
Não	0	1		

Portanto não rejeitamos a hipótese nula de independência. Ou seja, o uso de agrotóxico não tem associação com o aparecimento de formigamento para pessoas do genótipo A, B e C.

Segue análise para o sintoma “Miose”:

Tabela 49 - Análise para o sintoma “Miose”

Genótipo A				
Agrotóxico	Miose		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	9	164	1	1
Não	1	16		
Genótipo B				
Agrotóxico	Miose		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	3	81	0,7825	0,3095
Não	1	7		
Genótipo C				
Agrotóxico	Miose		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	0	11	0,003892	-
Não	0	1		

Portanto não rejeitamos a hipótese nula de independência. O resultado apresentado pelo teste qui-quadrado não traz significância estatística devido ao baixo número de observações. Ou seja, o uso de agrotóxico não tem associação com o aparecimento de miose para pessoas do genótipo A, B e C.

Segue a análise para o sintoma “Câimbras”:

Tabela 50 - Análise para o sintoma “Câimbras”

Genótipo A				
Agrotóxico	Câimbras		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	107	66	0,6468	0,6032
Não	9	8		
Genótipo B				
Agrotóxico	Câimbras		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	49	35	1	1
Não	5	3		
Genótipo C				
Agrotóxico	Câimbras		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	5	6	1	1
Não	0	1		

Portanto não rejeitamos a hipótese nula de independência. Ou seja, o uso de agrotóxico não tem associação com o aparecimento de câimbras para pessoas do genótipo A, B e C.

Segue a análise para o sintoma “Dor no corpo”:

Tabela 51 - Análise para o sintoma “Dor no corpo”

Genótipo A				
Agrotóxico	Dor no corpo		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	124	49	0,1831	0,1624
Não	9	8		
Genótipo B				
Agrotóxico	Dor no corpo		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	56	28	0,9316	1
Não	6	2		
Genótipo C				
Agrotóxico	Dor no corpo		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	8	3	1	1
Não	1	0		

Portanto não rejeitamos a hipótese nula de independência. Ou seja, o uso de agrotóxico não tem associação com o aparecimento de dor no corpo para pessoas do genótipo A, B e C.

Segue a análise para o sintoma “Depressão”:

Tabela 52 - Análise para o sintoma “Depressão”

Genótipo A				
Agrotóxico	Depressão		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	24	149	0,9511	0,7144
Não	3	14		
Genótipo B				
Agrotóxico	Depressão		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	14	70	0,9155	0,6242
Não	2	6		
Genótipo C				
Agrotóxico	Depressão		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	2	9	1	1
Não	0	1		

Portanto não rejeitamos a hipótese nula de independência. Ou seja, o uso de agrotóxico não tem associação com o aparecimento de depressão para pessoas do genótipo A, B e C.

Segue a análise para o sintoma “Doenças cardiovasculares”:

Tabela 53 - Análise para o sintoma “Doenças cardiovasculares”

Genótipo A				
Agrotóxico	Doenças cardiovasculares		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	11	161	0,04308	0,03319
Não	4	13		
Genótipo B				
Agrotóxico	Doenças cardiovasculares		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	5	79	1	0,43
Não	1	7		
Genótipo C				
Agrotóxico	Doenças cardiovasculares		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	3	8	1	1
Não	0	1		

Portanto não rejeitamos a hipótese nula de independência para pessoas do genótipo B e C. No entanto, temos evidências para rejeitar a hipótese nula de independência entre o aparecimento de doenças cardiovasculares e o uso de agrotóxico para pessoas do genótipo A.

Segue a análise para o sintoma “Câncer”:

Tabela 54 - Análise para o sintoma “Câncer”

Genótipo A				
Agrotóxico	Câncer		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	4	169	0,9334	0,3774
Não	1	16		
Genótipo B				
Agrotóxico	Câncer		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	3	81	0,7825	0,3095
Não	1	7		
Genótipo C				
Agrotóxico	Câncer		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	0	11	0,003892	-
Não	0	1		

Portanto não rejeitamos a hipótese nula de independência. O resultado apresentado pelo teste qui-quadrado não traz significância estatística devido ao baixo número de observações. Ou seja, o uso de agrotóxico não tem associação com o aparecimento de câncer para pessoas do genótipo A, B e C.

Segue análise para o sintoma “Palpitação cardíaca”:

Tabela 55 - Análise para o sintoma “Palpitação cardíaca”

Genótipo A				
Agrotóxico	Palpitação cardíaca		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	31	142	0,8091	0,5234
Não	4	13		
Genótipo B				
Agrotóxico	Palpitação cardíaca		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	14	70	0,33	0,162
Não	3	5		
Genótipo C				
Agrotóxico	Palpitação cardíaca		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	4	7	1	1
Não	0	1		

Portanto não rejeitamos a hipótese nula de independência. Ou seja, o uso de agrotóxico não tem associação com o aparecimento de palpitação cardíaca para pessoas do genótipo A, B e C.

Segue a análise para o sintoma “Lesão em glândulas salivares”:

Tabela 56 - Análise para o sintoma “Lesão em glândulas salivares”

Genótipo A				
Agrotóxico	Lesão em glândulas salivares		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	11	162	0,7345	0,3275
Não	2	15		
Genótipo B				
Agrotóxico	Lesão em glândulas salivares		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	3	81	0,7825	0,3095
Não	1	7		
Genótipo C				
Agrotóxico	Lesão em glândulas salivares		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	0	11	0,003892	-
Não	0	1		

Portanto não rejeitamos a hipótese nula de independência. O resultado apresentado pelo teste qui-quadrado não traz significância estatística devido ao baixo número de observações. Ou seja, o uso de agrotóxico não tem associação com o aparecimento de lesões em glândulas salivares para pessoas do genótipo A, B e C.

Segue a análise para o sintoma “Malformação”:

Tabela 57 - Análise para o sintoma “Malformação”

Genótipo A				
Agrotóxico	Malformação		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	1	172	1	1
Não	0	17		
Genótipo B				
Agrotóxico	Malformação		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	2	82	1	1
Não	0	8		
Genótipo C				
Agrotóxico	Malformação		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	1	10	1	1
Não	0	1		

Portanto não rejeitamos a hipótese nula de independência. Ou seja, o uso de agrotóxico não tem associação com o aparecimento de malformação para pessoas do genótipo A, B e C.

Segue a análise para o sintoma “Hiperatividade”:

Tabela 58 - Análise para o sintoma “Hiperatividade”

Genótipo A				
Agrotóxico	Hiperatividade		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	17	155	1	0,6821
Não	2	15		
Genótipo B				
Agrotóxico	Hiperatividade		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	5	77	0,8788	0,3539
Não	1	5		
Genótipo C				
Agrotóxico	Hiperatividade		p-valor	
	Sim	Não	Qui-quadrado	Fisher
Sim	3	8	0,7119	0,3333
Não	1	0		

Portanto não rejeitamos a hipótese nula de independência. Ou seja, o uso de agrotóxico não tem associação com o aparecimento de hiperatividade para pessoas do genótipo “A”, “B” e “C”.

Resumidamente (e de maneira a facilitar a compreensão dos resultados descritos neste estudo), através das análises estatísticas, observamos correlações significantes ($P < 0,05$) entre o uso de agrotóxicos e os seguintes sintomas/doenças para cada grupo de genótipos (“A”, “B” e “C”):

Tabela 59 - Síntese dos Resultados Significantes

Doença/Sintoma	Grupo	p-valor (Qui-quadrado)	p-valor (Fisher)
Alterações na pressão arterial	A	0,003717	0,003055
Doenças cardiovasculares	A	0,04308	0,03319
Doenças renais	A	0,06536	0,02635
Déficit de atenção	B	0,01782	0,020081
Abortamentos	B	0,0007	0,00409

Entretanto, para os sintomas/doenças: câncer, miose, lesão em glândulas salivares, hepatite, os resultados apresentados pelo teste Qui-quadrado não trazem significância estatística devido ao baixo número de observações. Sendo assim, esta pesquisa não foi capaz de evidenciar a existência de associação entre o uso de agrotóxicos e o aparecimento desses sintomas/doenças em indivíduos com os genótipos “A”, “B” e “C” na população de estudo.

7 DISCUSSÃO

Os resultados apresentados neste trabalho demonstram que os agricultores do sul do estado do Espírito Santo que utilizaram agrotóxicos desenvolveram/apresentaram alterações na pressão arterial, doenças cardiovasculares e renais, além de aborto e déficit de atenção, de maneira dependente e correlacionada ao genótipo de *CYP2C9* que possuem. Destaca-se entre os agrotóxicos utilizados pelos agricultores capixabas o glifosato. Segundo Gress (2015), o glifosato inibe o crescimento das plantas por interferência na produção de aminoácidos aromáticos essenciais por inibição da enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintase (EPSPS). Essa enzima catalisa a formação de 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato a partir de fosfoenolpiruvato (PEP) e shikimato-3-fosfato, responsáveis pela biossíntese do corismato, intermediário na biossíntese de fenilalanina, tirosina e triptofano, ausência esta, que em mamíferos pode explicar a toxicidade sistêmica relativamente baixa para o glifosato [dose letal mediana oral (LD50) para ratos 4.320 mg / kg, coelhos 3.800 mg / kg].

Conforme descrito anteriormente, no ambiente terrestre, o glifosato é principalmente biodegradado em ácido aminometilfosfônico (AMPA) quando metabolizado por bactérias nos solos e pode causar vários problemas toxicológicos quando absorvido. O AMPA é muito mais persistente no solo que a substância original. O mesmo pode ser lixiviado para as águas subterrâneas e transformar-se em formaldeído, que é carcinogênico e neurotóxico (BOHRER, 2000). De acordo com o estudo com animais em ratos *Sprague – Dawley*, aproximadamente 35 a 40% da dose administrada foi absorvida pelo trato gastrointestinal, e a urina e as fezes foram rotas igualmente importantes de eliminação após uma dose oral (10 mg / kg). Estudos em animais indicaram que praticamente nenhum metabolito tóxico de glifosato foi produzido quando administrado por via oral e que havia pouca evidência de atividade metabólica com essencialmente 100% da carga corporal de glifosato relacionada ao composto original.

Outro problema dos herbicidas à base de glifosato é a presença de N-nitrosoglifosato (NNG) como contaminante (0,1 ppm), que é uma substância altamente cancerígena (BOHRER, 2000). A substância NNG pode ser formada também no solo, na água ou no organismo humano quando o glifosato se combina com nitratos e nitritos. Os adubos químicos nitrogenados são importantes fontes de

nitratos e os alimentos convencionais produzidos com esses adubos possuem maiores teores dessas substâncias (BOHRER, 2000).

O glifosato é uma molécula de glicina com um grupo metil-fosfonil ligado ao átomo de nitrogênio. Como análogo da glicina, pode-se esperar que a glicina seja deslocada em pontos aleatórios no processo de síntese de proteínas, com consequências desconhecidas. Vários aminoácidos produzidos sinteticamente, análogos estruturais próximos de aminoácidos naturais, podem ser incorporados erroneamente nos peptídeos (RUBENSTEIN, RODGERS *et al. apud* SAMSEL, SENEFF, 2016).

Existem 20 aminoacil-tRNA sintetases únicas no sistema ribossômico, cada uma das quais reconhece especificamente um aminoácido, de acordo com o código do DNA. Curiosamente, não parece haver nenhum mecanismo de leitura de correção para o sistema ribossômico. Uma vez que um análogo de aminoácido burla o processo de reconhecimento, não há mecanismo para abortar a tradução e descartar uma sequência peptídica produzida erroneamente (RODGERS, SHIOZAWA, *apud* SAMSEL, SENEFF, 2016).

Uma citação direta de Rodgers (2002) deixa isso bem claro: "Certos análogos estruturais dos aminoácidos proteicos podem escapar à detecção pela maquinaria celular para síntese proteica e tornar-se mal incorporados na crescente cadeia polipeptídica de proteínas para gerar proteínas não nativas".

O glifosato, na verdade, é uma glicina N-substituída; isto é, uma unidade peptídica. Se o glifosato for incorporado incorretamente em um peptídeo em construção, ele poderá interferir na desmontagem do peptídeo defeituoso, levando ao acúmulo de cadeias peptídicas curtas não degradadas, com consequências desconhecidas no sangue ou nas células que abrigam essas proteínas defeituosas (SAMSEL, SENEFF, 2016).

Se o glifosato substituir a glicina nas sequências peptídicas em construção, é provável que os resultados sejam catastróficos em vários níveis. A evidência de que o glifosato interfere com os papéis da glicina como substrato, e também suprime a síntese de glicina, implica que o glifosato possa ser absorvido no lugar da glicina e posteriormente incorporado em um peptídeo durante a síntese proteica (SAMSEL, SENEFF, 2016).

Trabalhos anteriores de Samsel e Seneff (2016) apresentaram uma revisão da literatura sobre diversas proteínas biologicamente importantes que contêm regiões

ricas em glicina ou resíduos conservados/invariantes de glicina. A evidência suporta a probabilidade de que várias doenças e condições atualmente em ascensão possam ser causadas pela interrupção dos resíduos conservados de glicina, geralmente de maneira que seriam previstas com base nas propriedades físicas do glifosato.

As correlações entre o uso de glifosato e o recente aumento alarmante de várias doenças modernas são impressionantes, como apresentado em por Swanson (2014). Estes incluem obesidade, diabetes, doença renal terminal, insuficiência renal, autismo, doença de Alzheimer, demência, doença de Parkinson, esclerose múltipla, infecção intestinal, doença inflamatória intestinal, acidente vascular cerebral, leucemia, câncer de tireoide, câncer de fígado, câncer de bexiga, câncer de pâncreas e câncer de rins. Outro estudo, analisando dados de humanos e animais, revelou um crescimento no número de distúrbios em recém-nascidos que estão relacionados ao aumento da utilização de glifosato nas lavouras (HOY, SWANSON, SENEFF, 2015).

Estes incluem doenças cardíacas congênitas, distúrbios da pele, distúrbios gênitourinários, distúrbios do sangue, distúrbios metabólicos e pulmonares. Os trabalhos anteriores de Samsel e Seneff (2016) foram capazes de explicar algumas das patologias ligadas ao glifosato, predominantemente por seus poderosos efeitos quelantes, seus efeitos adversos nas bactérias intestinais benéficas, sua interferência no fornecimento de nutrientes cruciais (em muitos casos derivados da via do shiquimato) e a supressão das enzimas do citocromo P450 no fígado.

Neste estudo, foram observadas correlações entre o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e alterações na pressão arterial em indivíduos pertencentes ao grupo de metabolizadores normais "A" para *CYP2C9*. De acordo com Samsel e Seneff (2016), pode-se prever que a síntese de sulfato pela óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS) e a remoção de sulfato de moléculas sulfatadas bioativas sejam prejudicadas pelo glifosato para a substituição da glicina em locais críticos na eNOS e nas arilsulfatases. A eNOS também depende de glicina conservada para a síntese de óxido nítrico e a síntese prejudicada de óxido nítrico leva à hipertensão, o que poderia explicar as correlações com as cardiopatias encontradas no presente estudo.

Assim, torna-se aparente que, se o glicina for substituída pelo glifosato, a eNOS funcionará mal em ambos os seus papéis de produzir sulfato ou óxido nítrico. Isso

terá efeitos patológicos generalizados relacionados à hemólise excessiva (anemia), suprimento insuficiente de sulfato de colesterol aos tecidos e produção insuficiente de óxido nítrico (NO), levando a constrição vascular e hipertensão (SAMSEL, SENEFF, 2016).

Recentemente, foi demonstrado em testículos de ratos e células de Sertoli que o glifosato interrompe as funções reprodutivas masculinas ao desencadear a morte celular mediada por canal Ca^{++} -voltagem dependente do tipo L (CAVALLI *et al.*, 2016). Em particular, foi demonstrado que o glifosato a 360 ppm levou a uma diminuição importante no influxo de $^{45}\text{Ca}^{++}$, enquanto o mesmo a 36 ppm induziu um aumento na captação de $^{45}\text{Ca}^{++}$, um efeito atribuído ao glifosato e parcialmente impedido pelo Ca^{++} -voltagem dependente do tipo L, antagonista do canal nifedipina 10 $\mu\text{mol} / \text{l}$, indicando assim que a interrupção na homeostase do Ca^{++} desempenha um papel crítico nos efeitos tóxicos dos herbicidas a base de glifosato (HBG) (CAVALLI *et al.*, 2016).

Mais de 20 anos atrás, foi demonstrado que o glifosato aumentou a permeabilidade da membrana mitocondrial a prótons e Ca^{++} , sugerindo desde cedo um mecanismo para o efeito tóxico dos HBGs por uma ação quelante catiônica (OLORUNSOGO, 1990). No trabalho de Gress (2015), foi abordado especificamente essas hipóteses para investigar o mecanismo potencial pelo qual o glifosato pode ser arritmogênico nos tecidos cardíacos de mamíferos. Nos tecidos ventriculares de ratos e coelhos, Gress (2015) observou os efeitos do glifosato na eletrofisiologia *in vitro*.

Além disso, foi realizado um estudo complementar em tecidos ventriculares de ratos, usando agentes farmacológicos para aumentar a corrente de Ca^{++} -voltagem dependente do tipo L por BAY K 8644 (BECHEM, HOFFMANN, 1993) ou o conteúdo intracelular de Ca^{++} por ouabaína, um inibidor de $\text{Na}^{+} / \text{K}^{+}$ -ATPase (PASDOIS *et al.*, 2007), antes da infusão de glifosato. Os resultados encontrados por Gress (2015) se ajustam à hipótese de diminuição da captação de Ca^{++} como a possível consequência de uma ação quelante catiônica (CAVALLI *et al.*, 2013; OLORUNSOGO, 1993) para explicar os efeitos cardiotóxicos do glifosato.

Em outro estudo *in vivo* utilizando camundongos realizado pela Fiocruz em parceria com a Anvisa (2019), foram observados (durante o sacrifício) um aumento na incidência de cardiomiopatia nas fêmeas expostas à 100, 500 e 1.000 ppm de glifosato. Também foi observado um aumento significativo no número de mortes embrionárias, na incidência de fetos com malformação cardíaca (defeito no septo

interventricular e outras anomalias do coração). O traçado eletrocardiográfico demonstrou alterações em 20% dos casos, com taquicardia sinusal, alterações inespecíficas do seguimento ST e da onda T, com bradicardia e arritmias ventriculares (ANVISA, 2019).

Os efeitos cardiovasculares dos agrotóxicos observados em nosso estudo podem também estar correlacionados intimamente com o metabolismo da vitamina K, conforme descrito anteriormente (ZANGER *et al.*, 2008; SINGH *et al.*, 2007), pois se o mecanismo de coagulação for alterado, pode-se observar consequências no sistema cardiovascular que podem ser prejudiciais ao corpo humano.

Curiosamente, a bula de um dos produtos à base de glifosato produzido por uma grande empresa de agrotóxicos e produtos agrícolas, deixa claro que o herbicida causa efeitos cardiovasculares sérios em situações onde ocorrem intoxicações: “O suporte cardiovascular é essencial, pois um choque intratável tem sido a primeira ‘acusar’ de morte em intoxicações por glifosato”. Além desta constatação por parte da empresa, intrigantemente observamos o erro gramatical, onde citam “acusa” ao invés de “causa”. Além disso, na referida bula (glifosato), sobre os mecanismos de toxicidade, eles descrevem que “não se conhece o mecanismo de toxicidade específico para humanos”.

No entanto, eles citam que “Tem sido proposto o desacoplamento da fosforilação oxidativa que é uma via metabólica que utiliza energia libertada pela oxidação de nutrientes de forma a produzir trifosfato de adenosina (ATP)”. Além disso, eles descrevem que, em baixas concentrações não tóxicas ele causa efeito de desregulação sobre a enzima Aromatase em células de placenta humana *in vitro*, reduzindo a atividade da enzima aromatase e reduzindo a expressão da proteína StAR (proteína de regulação rápida da esteroidogênese), o que sugere que o glifosato possa causar efeitos deletérios sobre os mecanismos de esteroidogênese, com sérias consequências nos mecanismos hormonais no corpo humano. Ressaltamos que, se o glifosato exerce efeitos na síntese de hormônios, principalmente aqueles responsáveis pela regulação da pressão arterial, seus efeitos no sistema cardiovascular/alteração da pressão arterial serão evidentes.

Igualmente, uma outra informação muito importante citada na bula do glifosato sobre a toxicidade crônica do mesmo é que não é considerado carcinogênico, porém, é suspeito de ser um desregulador endócrino. A exemplo da 21-hidroxilase, codificada pelo gene *CYP21A2*, que recentemente foi descrita por estar envolvida na síntese

de alguns hormônios esteróides, incluindo o cortisol e a aldosterona (NEVES CRUZ *et al.*, 2019), sugerimos que, se o glifosato inibe a enzima CYP2C9 e, considerando que a mesma possa também estar envolvida na síntese de hormônios esteroidais, conseguimos entender como o glifosato possui uma ação na regulação endócrina e, ao mesmo tempo, sua influência direta nas alterações da pressão arterial dos agricultores que foram observadas neste estudo. Além disso, foi descrito recentemente que na deficiência da 21-hidroxilase, existe um espectro de manifestações clínicas, que incluem desde uma perda acentuada de sal até o óbito (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017), corroborando a hipótese acima descrita.

Outrossim, os ácidos epoxieicosatrienóicos (EETs), bem como o ácido 19-hidroxi-eicosatetraenóico e o ácido 20-hidroxi-eicosatetraenóico (19-HETE e 20-HETE) são os principais produtos do ácido araquidônico do metabolismo da monooxigenase do citocromo (CYP) P450 no rim. Entre as diversas atividades biológicas dos EETs renais (NATARAJAN, 2003), a inibição da reabsorção de sódio no túbulo coletor proximal e cortical, bem como a regulação das trifosfatases renais de Na⁺ / K⁺-adenosina são as que sugerem principalmente um papel dos EETs na pressão arterial (MAKITA *et al.*, 1994; CAPDEVILA *et al.*, 2007).

Em modelos animais, o excesso de sal na dieta leva a formação aumentada de EET e aumentos nos níveis urinários de EET. Esses achados são acompanhados e possivelmente atribuíveis a uma regulação positiva do conteúdo renal de CYP2C e aumento da atividade (MAKITA *et al.*, 1994; ZHAO *et al.*, 2003), sugerindo uma resposta adaptativa da formação renal de EET ao excesso de sal na dieta. Além disso, a incapacidade de regular positivamente a atividade renal do CYP2C tem sido associada à hipertensão sensível ao sal em ratos (MAKITA *et al.*, 1994; LICLICAN *et al.*, 2009).

Demonstrou-se que o CYP2C9 é uma epoxigenase importante que participa da biossíntese de EET no rim humano (ENAYETALLAH *et al.*, 2006). Entre as várias variantes alélicas do CYP2C9 identificadas, o CYP2C9*2 e o CYP2C9*3 são de interesse especial, pois afetam regiões funcionalmente importantes da enzima. CYP2C9*2 (Arg144Cys) e CYP2C9*3 (Ile359-Leu) levam à diminuição da função enzimática (ZHOU *et al.*, 2009). Muito recentemente, foram observadas diferenças relacionadas ao genótipo CYP2C9 na atividade da renina plasmática (PRA) e nos níveis plasmáticos de aldosterona em pacientes hipertensos (DONNER *et al.*, 2009). Foi proposto que a atividade reduzida do sistema renina-angiotensina-aldosterona

(RAAS) em portadores do *CYP2C9**3 possa refletir uma redução na síntese do EET, levando ao aumento da atividade do canal epitelial renal de sódio (ENaC) e reabsorção de sódio e, portanto, hipertensão sensível nesses indivíduos (DONNER *et al.*, 2009). Consequentemente, as variantes do *CYP2C9* aparecem como novos candidatos para a base genética da regulação da pressão arterial sensível ao sal e da hipertensão (BARLASSINA *et al.*, 2007), corroborando os resultados obtidos neste estudo.

Também foi encontrado no presente estudo correlação entre o uso de agrotóxicos e o surgimento de doenças renais para o grupo de metabolizadores normais “A” de *CYP2C9*. Nossos resultados são corroborados pelos estudos de Seneff (2019), em que foi descrito que o glifosato, mesmo sem os formuladores adicionados, possui um mecanismo insidioso de toxicidade único que envolve a substituição errônea do aminoácido codificador glicina durante a síntese protéica. Isso leva à ruptura de proteínas que são críticas para a desintoxicação e remoção de outros produtos químicos ambientais, fazendo com que sejam muito mais nefrotóxicos do que seriam normalmente. A nefropatia causada pelo glifosato e a desidratação apresenta um caminho de exploração para futuras pesquisas sobre essa crise global de saúde entre trabalhadores agrícolas.

As análises estatísticas das tendências das doenças mostraram que várias doenças crônicas estão aumentando em incidência nos Estados Unidos nas últimas duas décadas, acompanhando o aumento dramático no uso de glifosato nas culturas principais. Corroborando os resultados encontrados neste trabalho, destacamos o trabalho de Swanson *et al.* (2014) que demonstra correlações entre o aumento no uso de glifosato e doença renal em estágio terminal.

Em nosso estudo, observamos que os agricultores classificados como metabolizadores intermediários (B) e que utilizaram agrotóxicos, apresentaram em demasia o sintoma “déficit de atenção” quando comparados com os agricultores que não utilizaram agrotóxicos. Apesar de não encontrarmos na literatura uma correlação direta com esse sintoma, observamos que diversos pesquisadores têm encontrado correlações entre a utilização de agrotóxicos e surgimento de doenças como autismo e Alzheimer, que poderiam ser, em última análise, uma consequência (ou estar correlacionado) ao sintoma “déficit de atenção”. Um dos mecanismos envolvidos no surgimento dessas doenças é a capacidade do glifosato quelar metais. Um estudo recente sobre gado leiteiro dinamarquês investigou a composição mineral no soro de

bovinos alimentados com ração onde se foi utilizado o glifosato (KRÜGER *et al.*, 2013) em que foi identificado uma deficiência acentuada em dois minerais: cobalto sérico e manganês (Mn) sérico.

Todos os bovinos de oito fazendas diferentes apresentavam grave deficiência de Mn, além de quantidades mensuráveis de glifosato na urina. Na Austrália, após duas temporadas de altos níveis de natimortos em bovinos, verificou-se que todos os bezerros mortos eram deficientes em Mn (MCLAREN *et al.*, 2007).

De acordo com Samsel e Seneff (2015), Mn é um dos 14 oligoelementos essenciais no organismo humano. O Mn desempenha papéis essenciais na proteção antioxidante, síntese de glutamina, desenvolvimento ósseo e motilidade espermática, entre outros. Notavelmente, a deficiência de Mn pode explicar muitas das patologias associadas ao uso do glifosato, destacando-se o autismo e a doença de Alzheimer, assim como o déficit de atenção (este último observado neste estudo). A incidência de autismo e a doença de Alzheimer têm aumentado a uma taxa alarmante nas últimas duas décadas, acompanhando o aumento do uso de glifosato nas culturas de milho e soja nos Estados Unidos. Embora a correlação não signifique necessariamente a causa, de 1995 a 2010 (SWANSON *et al.*, 2014), as taxas de autismo na primeira série na escola pública se correlacionam quase perfeitamente ($P = 0,997$) com a aplicação total de glifosato nas culturas de milho e soja e essa correlação notável requer uma investigação experimental adicional. Esses distúrbios neurológicos também estão associados ao comprometimento mitocondrial (NAPOLI, WONG, GIULIVI, 2013; ROSSIGNOL, FRYE, 2012; SWERDLOW, BURNS, KHAN, 2010; YAO *et al.*, 2009) e ao excesso de glutamato e amônia no cérebro, (ADAMS *et al.*, 2011; GHANIZADEH, 2013; SHIMMURA *et al.*, 2011) levando a uma encefalopatia crônica de baixo grau (SEILER, 2002; SENEFF *et al.*, 2013).

Além da deficiência de Mn, que está criticamente associada a essas patologias, como comentado anteriormente, o ácido aminometilfosfônico (AMPA) pode ser lixiviado para as águas subterrâneas e transformado em formaldeído, que é neurotóxico (BOHRER, 2000). Esses dados encontrados na literatura que correlacionam o glifosato ao surgimento de doenças neurológicas podem estar associado ao sintoma/doença “déficit de atenção” encontrado no presente estudo para o grupo de metabolizadores intermediários “B” (*1/*2, *1/*3) da *CYP2C9*.

No presente estudo não foram encontradas correlações entre o uso de agrotóxicos e

os polimorfismos em *CYP2C9* com o surgimento de câncer, porém, na literatura encontramos vários estudos que nos mostram evidências do contrário ao encontrado neste trabalho. Um trabalho publicado por Samsel e Seneff (2015) faz uma revisão de diversas pesquisas correlacionando o glifosato ao surgimento de diversos tipos de câncer. Segundo Samsel e Seneff (2015), o glifosato provoca o surgimento de tumores, suprimindo enzimas cruciais na cadeia de transporte de elétrons, como por exemplo a succinato desidrogenase e a fumarato hidratase. Além disso, o glifosato quela o manganês, reduzindo sua biodisponibilidade, sendo que o manganês é um importante catalisador do Mn-SOD (superóxido dismutase), que protege as mitocôndrias dos danos oxidativos, que podem, conseqüentemente, causar mutações no DNA. O glifosato também prejudica o metabolismo da frutose, devido ao acúmulo de PEP (fosfoenolpiruvato) após o bloqueio da via do shiquimato. Isso leva à síntese de vários açúcares de cadeia curta que são conhecidos por serem agentes glicantes altamente potentes, como metilglioxal e glioxalato.

Também segundo Samsel e Seneff (2015), o glifosato é prontamente nitrosilado e o nitrosil glifosato é conhecido por ser extremamente tóxico e carcinogênico. As vias microbianas convertem o glifosato em sarcosina, um marcador conhecido para câncer de próstata, provavelmente devido à sua forma nitrosilada. Um aspecto muitas vezes esquecido da toxicidade do glifosato é sua interferência com enzimas que têm glicina como substrato, devido à semelhança estrutural de ambos. Os compostos fenólicos são desintoxicados pelas bactérias intestinais através da conjugação de glicina para produzir produtos como o hipurato (SAMSEL, SENEFF, 2015). As bifidobactérias são importantes para o papel que desempenham na proteção desses xenobióticos através dessa conjugação (SAMSEL, SENEFF, 2015). O hipurato reduzido está ligado às doenças de Crohn e à doença inflamatória intestinal, que mostram tendências epidemiológicas que correspondem ao aumento do uso de glifosato nas culturas principais e que estão ligadas ao risco aumentado de diversos tipos de câncer, principalmente o linfoma não Hodgkin (SAMSEL, SENEFF, 2015).

O linfoma também tem sido associado ao glifosato através de estudos de exposição ambiental em ambientes agrícolas. Vários estudos, *in vitro* e *in vivo*, mostraram que o glifosato danifica o DNA, um passo direto para a tumorigenicidade (SAMSEL, SENEFF, 2015). Estes estudos foram realizados em ouriços do mar, peixes, camundongos e vários tipos de células humanas *in vitro*. Além disso, crianças na

Malásia que vivem perto de arrozais têm evidências de danos em seu DNA devido ao agrotóxico glifosato (SAMSEL, SENEFF, 2015).

Diversos estudos epidemiológicos apoiam fortemente as correlações entre o glifosato e surgimento de cânceres múltiplos, com tendências ascendentes extremamente bem combinadas em várias formas de câncer, acompanhadas do aumento do uso de glifosato nas culturas de milho e soja. Embora essas fortes correlações não possam provar causalidade, as evidências biológicas são fortes o bastante para apoiar mecanismos que provavelmente estão envolvidos na carcinogênese, o que pode explicar as correlações observadas através de argumentos científicos plausíveis (SAMSEL, SENEFF, 2015).

Neste estudo foram encontradas correlações entre o uso de agrotóxicos e a ocorrência de abortos na população de agricultores analisada para o grupo “B” de genótipos de *CYP2C9* (metabolizadores intermediários). O estudo de Swanson *et al.* (2014) apresentou dados relevantes que podem corroborar nossos resultados. Ainda segundo Swanson *et al.* (2014), as propriedades desreguladoras endócrinas do glifosato podem levar a problemas reprodutivos, tais como infertilidade, aborto espontâneo, defeitos congênitos e alterações no desenvolvimento sexual. Fetos, lactentes e crianças são especialmente suscetíveis porque estão continuamente em crescimento e passando por alterações hormonais. Sabe-se que para um crescimento e desenvolvimento ideais, é crucial que seu sistema hormonal esteja funcionando corretamente e há relatos crescentes de glifosato (e formulações à base de glifosato) causam disfunção sexual, baixo peso ao nascer, menos nascimentos e esterilidade em animais de laboratório, animais de fazenda e humanos (SWANSON, 2014). Estes estudos corroboram os resultados observados no presente trabalho, em que foi encontrada correlação entre o uso de agrotóxicos (em destaque o glifosato) e o surgimento de abortos nas mulheres agricultoras consideradas como metabolizadoras intermediárias “B”, assim como outras doenças/sintomas, de acordo com o genótipo de *CYP2C9* em questão.

Dentre os estudos brasileiros sobre *CYP2C9*, destacam-se as análises realizadas por Vianna-Jorge *et al.* (2004), Perini *et al.* (2008) e Suarez-Kurtz *et al.* (2012), em que são descritas as frequências dos alelos *1, *2 e *3. Ressaltamos que as frequências obtidas neste trabalho (Tabelas 2 e 3) estão de acordo com o que já foi descrito para a população brasileira pelos referidos autores. O estudo de Suarez-Kurtz *et al.* (2012) revela a distribuição da frequência dos alelos de *CYP2C9* na

população brasileira em geral (diferenciados entre raça/cor). O estudo de Vianna-Jorge *et al.* (2004) demonstra o nível pronunciado de mistura na população tri-híbrida brasileira, com raízes ameríndias, europeias e africanas e o estudo de Perini *et al.* (2008) mostra a distribuição de *CYP2C9* em uma população nativa e não nativa brasileira com ascendência japonesa. Neste comparativo, podemos observar as semelhanças entre as frequências alélicas de *CYP2C9* nos diferentes estudos, onde o alelo *1 possui uma frequência relativamente maior do que os demais alelos, seguido pelo alelo *2 e por fim o alelo *3 que possui a menor frequência de todos.

Surpreendentemente, os resultados obtidos nesse estudo demonstraram que indivíduos classificados como metabolizadores normais “A” para a enzima *CYP2C9* (*1/*1) (e que utilizaram agrotóxicos) são mais suscetíveis a desenvolver alguma doença/sintoma em relação aos indivíduos portadores das variantes polimórficas dos grupos de metabolizadores “B” (*1/*2, *1/*3) e “C” (*2/*2, *2/*3 e *3/*3) nos agricultores do Espírito Santo analisados.

Conforme descrito anteriormente, todos os genótipos foram divididos em classes de acordo com a capacidade de metabolização da referida enzima. Na classe dos metabolizadores intermediários (B), foi observada correlação com o surgimento de déficit de atenção e abortamentos e já na classe dos metabolizadores normais (A), notou-se correlação com alterações na pressão arterial, doenças cardiovasculares e doenças renais. Pelo fato do genótipo A (*1/*1) ser pertencente ao grupo dos metabolizadores normais para *CYP2C9*, sendo o mais presente na população mundial, é necessário investigar a razão para tais associações com os sintomas apresentados acima. Diferentemente, não foi encontrada correlação com o surgimento de sintomas/doenças na classe de metabolizadores lentos (C) que utilizaram agrotóxicos. Sabe-se que o glifosato possui a capacidade de inibir a enzima *CYP2C9* de diferentes formas, através da substituição do aminoácido glicina durante a tradução da proteína e através da sua capacidade queladora de metais (SENEFF, 2019). A *CYP2C9* possui um centro heme de ferro, e o mesmo é quelado pelo herbicida, inativando a enzima (SAMSEL, SENEFF, 2016).

Com base nos resultados encontrados neste estudo, sugerimos que as variantes polimórficas de *CYP2C9* poderiam gerar enzimas com estruturas tridimensionais distintas, possivelmente levando a uma proteção natural contra efeitos inibidores do glifosato. Neste sentido, em um contexto de exposição a agrotóxicos, metabolizadores B e C teriam vantagem em relação aos indivíduos A: os primeiros

manteriam certo um nível de atividade enzimática, embora não ótimo, graças a uma menor afinidade entre as versões polimórficas da enzima e o xenobiótico. Já os metabolizadores normais apresentariam atividade nula ou residual tendo em vista os mecanismos ora citados de inibição.

Até o presente momento não foram descritas enzimas metabolizadoras (incluindo todas as CYPs) que possuam a capacidade de metabolizar o glifosato em mamíferos, o que teoricamente tornaria o produto inerte dentro do organismo. Porém, metabólitos secundários do glifosato gerados por bactérias presentes no solo e na flora intestinal, assim como o glifosato em si (SAMSEL, SENEFF, 2016), possuem elevada toxicidade, e os mesmos poderiam ser absorvidos junto com o herbicida, fator este que poderia acarretar o surgimento de doenças.

De acordo com os resultados obtidos neste estudo, e com as informações acima descritas obtidas da literatura, desenvolvemos algumas hipóteses que deverão ser comprovadas em um futuro próximo. Primeiramente, é descrito na literatura que o glifosato inibe a enzima CYP2C9 (KITCHEN, WITT, RIECK, *apud* GUNATILAKE, SENEFF, ORLANDO, 2019) e, dessa maneira, os xenobióticos que ela metabolizaria se acumulam gerando efeitos tóxicos (nefro e cardiotoxicidade, aborto e déficit de atenção). Nós nos questionamos se existe diferença das enzimas polimórficas (de acordo com sua estrutura) em que de acordo com o polimorfismo uma proteína alterada seria produzida e o glifosato teria maior ou menor afinidade pela mesma. Por exemplo, poderíamos imaginar que: os agrotóxicos possuiriam uma maior atração às enzimas dos agricultores com o genótipo “A” (normais) do às enzimas dos agricultores do genótipo “B” (intermediários). Além disso, nós questionamos se os agrotóxicos poderiam se ligar de maneira diferencial às CYPs polimórficas e inibi-las diferencialmente. No presente estudo observamos que os agricultores com os genótipos “A” e “B” (metabolizadores normais e intermediários) foram os mais afetados, enquanto os agricultores com os genótipos “C” (metabolizadores lentos) foram protegidos.

Em síntese, perguntamos: será que o glifosato possuiria o potencial de inibir diferencialmente as isoformas de CYP2C9? Pois nossos resultados sugerem que diferentes genótipos de CYP2C9 estão relacionados (ou podem contribuir) com o surgimento de doenças cardíacas e renais, aborto e déficit de atenção em agricultores que utilizam agrotóxicos no estado do Espírito Santo.

Outrossim, desenvolvemos uma segunda hipótese, que é complementar à hipótese

acima discutida: os agricultores que são classificados com o genótipo “A” (ou metabolizadores normais) e aqueles do genótipo “B” (metabolizadores intermediários) dependeriam mais da enzima CYP2C9 e, quando a mesma fosse inibida pelos agrotóxicos, os xenobióticos que ela metabolizaria se acumulariam de maneira abundante no organismo causando doenças. Diferentemente, os indivíduos com o genótipo “C”, por serem metabolizadores lentos, seriam menos dependentes (ou mais "independentes") da CYP2C9 e, dessa maneira, quando a mesma fosse inibida pelos agrotóxicos não causaria problemas graves nos agricultores. Essa hipótese poderia ser mais compreensível se observássemos alguma via metabólica redundante em relação à atividade de CYP2C9, ou seja, uma via secundária de metabolização que poderia ser reforçada na ausência da enzima em estudo, como uma espécie de via “substituta”.

Ademais, desenvolvemos uma terceira hipótese, que é complementar às duas hipóteses discutidas anteriormente: poderia uma determinada isoforma de CYP2C9 possuir maior atividade catalítica? Neste caso, pessoas que expressam mais esta determinada isoforma possuiriam maior resistência (ou maior sensibilidade) à toxicidade e conseqüentemente maior resistência (ou maior sensibilidade) a desenvolver doenças (apesar dos alelos *2 e *3 serem conhecidos por gerar enzimas com atividade reduzida em relação a *1). Dessa maneira pergunta-se: uma determinada isoforma de CYP2C9 poderia conferir maior resistência (ou maior sensibilidade) ao desenvolvimento de doenças, visto que o polimorfismo do gene poderia gerar uma proteína com diferença estrutural em uma determinada região que resultaria em diferença no reconhecimento do substrato, afetando a cinética de hidrólise do mesmo? Ou seja, o polimorfismo poderia gerar uma enzima que possuísse alterações em seu sítio ativo e, dessa maneira, apresentaria uma diferente taxa de metabolização? Ressaltamos que, segundo esta hipótese, essa taxa de metabolização poderia ser aumentada ou diminuída, de acordo com a isoforma em questão.

No caso específico deste estudo, os indivíduos com os genótipos/isoformas considerados “normais” “A” e “intermediários” “B” foram os mais afetados, enquanto os genótipos/isoformas considerados “lentos” “C” foram os mais protegidos. Sendo assim, verificar a estabilidade e a eficiência das diferentes isoformas de CYP2C9 frente ao glifosato seria muito interessante e importante para compreender os resultados obtidos neste trabalho.

Alternativamente às três hipóteses anteriores (e, conforme salientado anteriormente que, até o momento, não foi descrito na literatura que alguma CYP seja capaz de metabolizar o glifosato), nós nos perguntamos se a metabolização do glifosato poderia gerar algum composto tóxico. Pois se isso ocorresse então quem foi classificado com o genótipo de *CYP2C9* “normal” “A” e “intermediário” “B” geraria o composto tóxico em maior quantidade o que causaria as doenças cardiovasculares e renais, aborto e déficit de atenção, enquanto quem é classificado como metabolizador “lento” “C” não produziria o composto tóxico, e conseqüentemente, não desenvolveria as doenças. Segundo esta hipótese o polimorfismo de *CYP2C9* geraria diferentes enzimas com diferentes taxas de metabolização dos pesticidas e seus produtos “tóxicos”. Sendo assim, uma atividade diferente de *CYP2C9* geraria a alta toxicidade dos pesticidas e a alta sensibilidade dos agricultores considerados metabolizadores normais “A” e intermediários “B”.

Neste contexto, foi citado recentemente na literatura que as impurezas toxicologicamente relevantes descritas do glifosato são o N-nitrosoglifosato e o AMPA/formaldeído (ANVISA, 2018). Em concordância com a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO), Nota Técnica da Fiocruz e a Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (EFSA), a ANVISA mantém em 0,001 g/Kg o limite máximo de N-nitrosoglifosato para os produtos à base de glifosato. Conforme descrito anteriormente (BOHRER, 2000), o AMPA pode ser convertido em formaldeído e o mesmo é considerado uma substância carcinogênica e neurotóxica para os seres humanos, classificada no Grupo 1 pela IARC, e a Anvisa determina que o limite máximo de resíduo seja diminuído de 1,3g/Kg para 1,0g/Kg de glifosato (ANVISA, 2018).

Apesar de nós não encontrarmos correlação entre o surgimento de câncer nos agricultores e a utilização de agrotóxicos, nós encontramos associação com o sintoma “déficit de atenção” naqueles considerados metabolizadores intermediários “B” e que usaram agrotóxicos, o que poderia estar correlacionado à presença da substância neurotóxica formaldeído nos mesmos.

Diferentemente, foi citado na bula do glifosato que o único metabólito excretado encontrado em pequenas quantidades seria o ácido aminometílico fosfônico (AMPA). Foi descrito que a microinjeção de AMPA no núcleo de trato solitário (NTS) de ratos não anestesiados promove hipertensão, bradicardia e vasoconstrição nos leitos renal, mesentérico e aórtico, sendo que neste, uma subsequente vasodilatação é

observada para doses acima de 5 picomolar de AMPA (DIAS *et al.*, 2003). Considerando que o ácido aminometílico fosfônico (AMPA) é o principal metabólito do glifosato excretado em mamíferos, e, se o mesmo causa alterações cardiovasculares, podemos então compreender o motivo pelo qual os agricultores que são 1*/1* (metabolizadores normais) apresentaram mais problemas cardíacos, visto que nesses indivíduos o AMPA causaria os referidos efeitos cardiovasculares. Os agricultores considerados metabolizadores intermediários “B” e lentos “C” estariam, então, protegidos desses efeitos nocivos do AMPA sobre o sistema cardiovascular (dos mesmos).

Geralmente, quando se usa clinicamente a Farmacogenética para aconselhar um paciente em que se estuda a variabilidade interindividual na resposta aos medicamentos devida a fatores genéticos, a base conceitual utilizada está de acordo com esta última hipótese (descrita acima), e citamos como exemplo a conversão de codeína em morfina, em que a conversão muito rápida gera toxicidade (MARCOLIN, 2004). Nessa lógica, a conversão do agrotóxico em um produto tóxico pode ser minimizada por uma ação mais lenta do seu metabolismo. Ocorre que não foi encontrado na literatura evidências de que a enzima CYP2C9 seria capaz de metabolizar o glifosato. Curiosamente, na bula do glifosato descreve-se que, em mamíferos, o mesmo é pobremente absorvido pela via oral, não é metabolizado e é excretado principalmente inalterado e que aproximadamente (70-80)% da dose administrada é eliminada nas fezes e (20-30)% na urina, nas primeiras 72 horas. Além disso, o único metabólito excretado, encontrado em pequenas quantidades seria o ácido aminometílico fosfônico (AMPA). Eles ainda descrevem que menos de 1% da dose absorvida permaneceu principalmente no fígado, intestino delgado e nos ossos e que experiências em humanos sugerem que a meia vida do glifosato é de (2-3) horas. A absorção dérmica foi baixa em modelo experimental *in vitro* para pele humana (2,3%) e esta baixa absorção foi confirmada também em estudos em macacos. Outrossim, descrevem que o glifosato não tem potencial de acumulação e não foi detectável no leite de vaca ou nos ovos de galinhas.

Recentemente, foi descrito que os produtos de degradação do glifosato variam segundo o tipo de cultura em que o ingrediente ativo é aplicado, e conforme já descrito, o resíduo mais comum é o Ácido Aminometilfosfônico (AMPA), sendo que o mesmo possui toxicidade semelhante ao glifosato. Para algumas plantas geneticamente modificadas com o gene do tipo GATHRA ou GAT, ainda não

autorizadas no Brasil, outros dois resíduos estão presentes: o N-acetil-glifosato e N-acetil-AMPA, e segundo a ANVISA, a toxicidade destes últimos não é maior que a do glifosato (ANVISA, 2018).

Nas plantas não resistentes ao glifosato, segundo a EFSA, este ingrediente ativo é o único resíduo encontrado nas folhas. Nas raízes e tubérculos, o glifosato e o AMPA podem ser encontrados em níveis semelhantes, geralmente muito baixos. Para plantas resistentes ao glifosato com as alterações genéticas CP4-EPSPS ou GOX (ainda não comercializadas no Brasil) ou ambas, os resíduos de glifosato e AMPA foram considerados relevantes pela EFSA, tanto para as folhas como para grãos (ANVISA, 2018). Para as plantas com alterações genéticas do tipo GAT (ainda não comercializadas no Brasil), o principal resíduo foi o N-acetil-glifosato. Assim, a Anvisa define que, para fins de conformidade de limites máximos de resíduos (LMR), deverão ser avaliados para as culturas com a modificação do tipo GAT os resíduos glifosato + N-acetil-glifosato. Para todas as demais culturas, apenas o resíduo de glifosato deve ser avaliado. Como plantas com a modificação do tipo GAT não são comercializadas no Brasil, deverá ser incluída na monografia do glifosato apenas o LMR para resíduos de glifosato. Ainda, a Anvisa deverá avaliar a pertinência de inclusão do AMPA nos LMR definidos na monografia do glifosato se houver a autorização de uso de plantas com modificações genéticas do tipo GOX.

Para avaliação do risco dietético, não há informação suficiente para cada cenário de aplicação (pré-emergência, pós-emergência ou dessecação) e pode-se observar grande variação nas concentrações do glifosato e seus metabólitos encontrados nas culturas (ANVISA, 2018). Portanto, para avaliação do risco dietético, a Anvisa define que os resíduos deverão ser expressos a partir da somatória dos resíduos de glifosato + AMPA para todas as culturas, exceto para aquelas que eventualmente sejam comercializadas no Brasil com a alteração do tipo GAT. Para estas, os resíduos devem ser expressos na somatória de glifosato + AMPA + N-acetil-glifosato + N-acetil-AMPA. Vale destacar que o Programa de Análise de Resíduos de Alimentos (PARA) já implantou, com base no Parecer Técnico de Reavaliação (PTR) nº 19/2017, o monitoramento de resíduos de glifosato+AMPA nas suas análises de resíduos (ANVISA, 2018). Conforme essas espécies geneticamente modificadas ainda não foram comercializadas no Brasil, esses resíduos tóxicos não possuem correlação com o presente estudo, no entanto, num futuro próximo, os mesmos deverão ser investigados se causam problemas à saúde dos agricultores e da

população em geral.

Chegamos à conclusão que este estudo envolve um grau de complexidade bem maior e, de maneira a compreender quais fatores contribuiriam para explicar os mecanismos envolvidos na toxicidade dos agrotóxicos no organismo humano são necessárias hipóteses mais complexas. A inibição da CYP geralmente não é uma inibição direta, mas ocorre através de competição com outro substrato (MARCOLIN, 2004), ou seja, enquanto a CYP estaria metabolizando o glifosato, outro substrato tóxico não estaria sendo metabolizado, que se acumularia e causaria doenças. Nesse caso, o composto prejudicial não seria o glifosato, mas outro agente tóxico que estaria também presente no sangue dos seres humanos. Ocorre que a CYP2C9 está envolvida no metabolismo de diversas substâncias, dentre elas muitos medicamentos, incluindo os hipoglicemiantes orais, anti-inflamatórios não esteroidais, diuréticos, anticonvulsivantes, inibidores de angiotensina II, antidepressivos, anticoagulantes orais (como a warfarina) entre outros (DALY *et al.*, 2017).

Além disso, esta enzima está envolvida no metabolismo de substratos endógenos como o ácido araquidônico e o linolênico (INGELMAN-SUNDBERG *et al.*, 2007; ZHOU *et al.*, 2008), e, sendo assim, teríamos que entender que outras substâncias também poderiam estar presentes no sangue de seres humanos e que poderiam causar a toxicidade observada neste estudo. É sabido que as CYPs também participam de metabolismo de esteróides e outros metabólitos endógenos (MARCOLIN, 2004), e é possível que a lentificação desta metabolização também possa causar problemas, por competição com o substrato.

De qualquer forma, deve-se pesquisar mais profundamente o mecanismo de ação dos agrotóxicos no corpo humano para que se possa confirmar qual dessas hipóteses realmente explicaria os resultados que obtivemos neste estudo. As análises estatísticas são essenciais para elaborar o desfecho de qualquer pesquisa relevante e, neste contexto, pretende-se realizar análises estatísticas adicionais visando saber se os agricultores fumantes e os etilistas teriam um risco maior de desenvolver esses (e outros) sintomas/doenças cumulativamente. As perspectivas deste trabalho também incluem verificar se aqueles agricultores que utilizam agrotóxicos há mais tempo poderiam desenvolver mais sintomas/doenças, assim como se a ocupação parental (se os pais já trabalhavam com pesticidas) e a nutrição são fatores que influenciariam/contribuiriam para o surgimento de doenças.

Além disso, a pergunta seguinte torna-se extremamente relevante: se os agricultores que manipulam diretamente os agrotóxicos possuem um risco maior de desenvolver diversos sintomas/doenças, qual seria o nível de risco para a população em geral que se alimenta com baixas dosagens de agrotóxicos diariamente na água e nos alimentos? Sabe-se que os alimentos contêm resquícios dos agrotóxicos (ABRASCO, 2012). Se a população em geral recebe baixas dosagens diárias de agrotóxicos nos alimentos (e na água), poderia, conseqüentemente, correr um maior risco de desenvolver doenças cardiovasculares, renais e até abortamentos de acordo com seus genótipos?

Essas perguntas são muito importantes e devemos realizar um esforço maior para que se busque o esclarecimento dessas questões, que deverão ser respondidas em estudos posteriores. Os próximos passos dessa pesquisa deverão incluir a avaliação do polimorfismo de *CYP2C9* na população em geral e verificar se existe correlação com os sintomas/doenças conforme observado nos agricultores do sul do Espírito Santo. E, além disso, avaliar outras doenças que ainda não foram investigadas, como o autismo, que conforme observado pela Dra. Stephanie Seneff poderia ser causado pela exposição aos agrotóxicos (SENEFF *et al.*, 2013). Além disso, pergunta-se: as pessoas da população em geral que são fumantes e etilistas teriam um risco maior de desenvolver esses sintomas/doenças?

Uma das alternativas dos caminhos futuros dessa pesquisa seria identificar outros genes e polimorfismos que tenham papel importante no desenvolvimento de doenças (com avaliação de risco individual), em uma metodologia que utilize não só grupos de agricultores, mas também de pessoas da população em geral. Em um primeiro momento, devemos estudar a exposição aguda e crônica dos agricultores tabagistas e etilistas e, em um momento posterior, o esforço seria o de pesquisar sobre a exposição crônica a que estão submetidos os cidadãos em geral que igualmente fazem uso de tabaco e bebidas alcoólicas.

Em resumo, o desenvolvimento de doenças é um evento de caráter multifatorial, cada um deles com um peso específico, e que, somados, contribuem para o surgimento das mesmas. Acreditamos que o uso de agrotóxicos realmente seja um fator de risco de grande peso e, dessa forma, este estudo mostra-se muito importante para o fornecimento de dados relacionados ao surgimento de doenças em conseqüência da exposição contínua aos agrotóxicos pela população capixaba de acordo com polimorfismo em *CYP2C9* que os agricultores possuem. Salientamos

que a importância deste estudo reside no número de indivíduos envolvidos (cerca de 300 indivíduos) e, além disso, no grande número de sintomas/doenças analisados (43 sintomas/doenças), sendo uma das iniciativas necessárias sobre um tema de bastante impacto na saúde humana na atualidade.

Outrossim, este estudo ressalta a importância que deve ser dada à manipulação/utilização dos agrotóxicos, visto que os mesmos podem causar doenças e isso está seriamente associado à responsabilidade das empresas produtoras desses insumos em apoiar a esse grupo de pessoas que, expostas aos pesticidas, necessitam de constante acompanhamento e amparo. Além disso, o recolhimento de embalagens vazias, vale ressaltar, deve ser um dos objetivos que norteiam uma logística cuidadosa.

Ademais, para minimizar os problemas causados pelo uso constante de agrotóxicos, é necessário treinamentos e sensibilização dos produtores, com intuito de aumentar a adesão ao uso dos equipamentos de proteção individual, uma vez que este recurso é o principal meio adotado para evitar problemas toxicológicos tanto para o homem quanto para o meio ambiente. Com este objetivo em mente, nós formulamos um protocolo de segurança para a manipulação de agrotóxicos (ANEXO II) em que descrevemos: as medidas de proteção pessoal; primeiros socorros; instruções em caso de acidentes; procedimentos de lavagem, armazenamento, devolução, transporte e destinação de embalagens vazias e restos de produtos impróprios para utilização ou em desuso; precauções para o manuseio seguro; precauções para quem lava a roupa dos agricultores; telefone do Disque-Intoxicação (ANVISA) para notificar o caso e obter informações especializadas sobre o diagnóstico e tratamento em caso de intoxicação por agrotóxicos. Ressaltamos que essas informações foram escritas de maneira simplificada em formato de mensagem de texto que foi enviada via aplicativo de “*WhatsApp*” aos agricultores de diversas comunidades participantes do estudo. Nosso objetivo, no futuro, será aprimorar essa ferramenta de divulgação dos cuidados que devem ser seguidos pelos agricultores e atingir o maior número de pessoas possível.

Este estudo ressalta a importância de serem realizadas pesquisas mais robustas e abrangentes em seres humanos no que diz respeito ao mecanismo de atuação/efeito dos agrotóxicos, em especial o glifosato. Nossos resultados demonstram que os agricultores do sul do estado do Espírito Santo que utilizaram agrotóxicos desenvolveram/apresentaram alterações na pressão arterial, doenças

cardiovasculares e renais, além de abortos e déficit de atenção, de maneira dependente e correlacionada ao genótipo de *CYP2C9* que possuem.

Destacamos, ainda, a importância de se continuar estudando os efeitos dos agrotóxicos sobre a saúde da população brasileira e mundial, assim como sua correlação com os polimorfismos de *CYP2C9*, visto que o fator mais preocupante é que a primeira causa de morte por doenças no mundo deve-se a problemas cardiovasculares (*WORLD HEALTH ORGANIZATION*, 2018). Nesse contexto faz-se a pergunta: seriam os agrotóxicos os responsáveis por contribuir para a principal causa de morte por doenças no mundo atualmente? Devemos ter em mente que o objetivo principal de se responder essa pergunta é a obrigação de alertar às pessoas sobre os perigos aos quais são submetidas ao se alimentar com agrotóxicos residuais presentes nos alimentos e na água consumidos diariamente e com efeitos cumulativos prejudiciais à saúde humana.

8 CONCLUSÃO

Realizamos uma análise comparativa das frequências dos principais alelos de *CYP2C9* com os obtidos em 3 diferentes estudos brasileiros e verificamos semelhanças entre as frequências das variantes alélicas observadas neste estudo e as obtidas nos estudos referidos anteriormente. O alelo *1 possui uma frequência relativamente maior do que os demais alelos, seguido pelo alelo *2 e, por fim, o alelo *3 que possui a menor frequência em todos os estudos. Outrossim, realizamos a análise de frequência genotípica para identificar se a população estudada está ou não de acordo com o equilíbrio de *Hardy-Weinberg*, e, de acordo com os resultados obtidos, podemos afirmar que a população deste estudo está em equilíbrio de *Hardy-Weinberg*.

Demonstramos que indivíduos que utilizam agrotóxicos e são classificados como metabolizadores normais “A” para a enzima *CYP2C9* (*1/*1) são mais suscetíveis a desenvolver alguma doença/sintomas em relação aos indivíduos portadores das variantes polimórficas dos grupos de metabolizadores “B” (*1/*2, *1/*3) e “C” (*2/*2, *2/*3 e *3/*3). Notamos, ainda, que nos metabolizadores intermediários “B” (que utilizam agrotóxicos) foi observada correlação com o surgimento de déficit de atenção e abortamentos e nos metabolizadores normais “A” (que utilizam agrotóxicos) notou-se correlação com alterações na pressão arterial, doenças cardiovasculares e doenças renais. Diferentemente, não foi encontrada correlação com o surgimento de sintomas/doenças na classe de metabolizadores lentos “C”.

Finalmente, com base nos resultados apresentados neste trabalho, verificamos que os agricultores do sul do estado do Espírito Santo que utilizaram agrotóxicos desenvolveram/apresentaram alterações na pressão arterial, doenças cardiovasculares e renais, além de aborto e déficit de atenção, de maneira dependente e correlacionada ao genótipo de *CYP2C9* que possuem. Destacamos, ainda, a importância de se continuar estudando os efeitos dos agrotóxicos sobre a saúde da população brasileira e mundial e sua correlação com os polimorfismos de *CYP2C9* com o objetivo principal de alertar às pessoas sobre os perigos aos quais estão submetidas ao se alimentar com agrotóxicos residuais presentes nos alimentos e na água consumidos diariamente e com efeitos cumulativos prejudiciais à saúde humana. O significado clínico do polimorfismo de *CYP2C9* frente ao glifosato deverá ser confirmado em estudos posteriores.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABASS, K., TURPEINEN, M., & PELKONEN, O. An evaluation of the cytochrome P450 inhibition potential of selected pesticides in human hepatic microsomes. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, 44(6), 553-563. 2009.

ABRASCO Augusto, L. G. S.; Carneiro, F. F.; Rigotto, R. M.; Friedrich, K.; Búrigo, A. C. (2012). Dossiê **Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde: agrotóxicos, saúde, ambiente e sustentabilidade**. Associação Brasileira de Saúde Coletiva. Rio de Janeiro: ABRASCO, 2012.

ADAMS, JB; AUDHYA, T; MCDONOUGH MEANS, S; RUBIN, RA; QUIG, D; GEIS, E *et al.* **Nutritional and metabolic status of children with autism vs. neurotypical children, and the association with autism severity**. *Nutr Metab* 2011;8:34.

ALAVANJA, M. C. R., SANDLER, D.P., LYNCH, C.F., KNOTT, C., LUBIN, J.H., TARONE, R., THOMAS, K., DOSEMECI, M., BARKER, J., HOPPIN, J.A., BLAIR, A. Cancer incidence in the Agricultural Health Study. **Scandinavian Journal of Work, Environ and Health**, Helsinki, v. 31, p. 9-45, Supplement 1. 2005.

ALAVANJA, MICHAEL CR; BONNER, MATTHEW R. Occupational pesticide exposures and cancer risk: a review. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B**, v. 15, n. 4, p. 238-263, 2012.

ALBUQUERQUE, P. C. C. D., GURGEL, I., GURGEL, A., AUGUSTO, L., & SIQUEIRA, M. Sistemas de informação em saúde e as intoxicações por agrotóxicos em Pernambuco. **Rev Bras Epidemiol**, 18(3), 666-78. <http://dx.doi.org/10.1590/1980-5497201500030012>. 2015.

ALENCAR, J. A. **Cultivo da videira: normas gerais sobre o uso de agrotóxicos**. (2a ed.). Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Recuperado de http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Uva/CultivodaVideira_2ed/agro_toxicos.html. 2010.

ANDREOTTI, G., FREEMAN, L. E. B., HOU, L., COBLE, J., RUSIECKI, J., HOPPIN, J. A., & ALAVANJA, M. C. Agricultural pesticide use and pancreatic cancer risk in the Agricultural Health Study Cohort. **International journal of cancer**, 124(10), 2495-2500. <http://doi.org/10.1002/ijc.24185>. 2009.

AVRAMOVA, N. **Austrian Lawmakers Vote to Ban Weed Killer Glyphosate**. CNN. 3 July 2019. Disponível em: <https://www.cnn.com/2019/07/03/health/austria-glyphosate-ban-weed-killer-bayer-intl/index.html>. Acessado em 4 dez. 2019.

ANVISA. **Consulta Pública nº 63, 2015**. Disponível em: <http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP%5b5142-1-0%5d.PDF>. Acessado em 4 dez. 2019.

ANVISA. **Índice Monográfico C36, 2019**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/C36%2B%2BCiproconazol.pdf/>

89804cbe-5a86-4711-a1b8-b8c7b0d24d82. Acessado em 3 dez. 2019.

ANVISA. **Índice Monográfico T48, 2019.** Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/T48%2BTiametoxam%2Batual.pdf/2a88d2f9-2177-460c-8dde-a4615d329823>. Acessado em 3 dez. 2019.

ARCHANJO, A. B. *et al.* **Alcoolismo, tabagismo e exposição aos agrotóxicos: avaliação epidemiológica e molecular como auxiliar na prevenção e questões de saúde.** Comunicação em Ciências da Saúde, v. 28, n. 01, p. 40-44, 2017.

BADALOTTI, R.; RENK, A.; FILIPPIN, E. S. **Reprodução social da agricultura familiar e juventude rural no oeste catarinense.** In Anais da Reunião de Antropologia do Mercosul, Porto Alegre, RS, Brasil, 7: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1, 97-108. 2007.

BAI, X., XIE, J., SUN, S., ZHANG, X., JIANG, Y., & PANG, D. **The associations of genetic polymorphisms in CYP1A2 and CYP3A4 with clinical outcomes of breast cancer patients in northern China.** *Oncotarget*, 8(24), 38367. 2017.

BALDI, L., COUREAU, G., JAFFRÉ, A., GRUBER, A., DUCAMP, S., PROVOST, D., LEBAILLY, P., VITAL, A., LOISEAU, H., SALAMON, R. **Occupational and residential exposure to electromagnetic fields and risk of brain tumors in adults: a case-control study in Gironde, France.** *Send to Int J Cancer*. Sep., 15;129(6):1477-84. 2011.

BARLASSINA C, Dal FC, Lanzani C, Manunta P, Guffanti G, Ruello A, et al. Common genetic variants and haplotypes in renal CLCNKA gene are associated to salt-sensitive hypertension. *Hum Mol Genet* 2007; 16:1630–1638.

BARRY, K. H., ZANG, Y., LAN, Q., ZAHM, S. H., HOLFORD, T. R. **Genetic variation in metabolic genes, occupational solvent exposure, and risk of non-Hodgkin Lymphoma.** *American J. Epidemiol*, 173(4): 404-13. 2011.

BECHEM, M.; HOFFMANN, H. **The molecular mode of action of the Ca agonist - BAY K 8644 on the cardiac Ca channel.** *Pflügers Archiv*, 424(3–4), 343–353, 1993.

BENACHOUR, N. & SÉRALINI, G. E. **Glyphosate formulations induce apoptosis and necrosis in human umbilical, embryonic, and placental cells.** *Chemical research in toxicology*, 22(1), 97-105. <http://doi.org/10.1021/tx800218n>. 2008.

BOHNER, T. O. L., Araújo, L. E. B., Nishijima, T. **O impacto ambiental do uso de agrotóxicos no meio ambiente e na saúde dos trabalhadores rurais.** Santa Maria Revista Eletrônica do Curso de Direito da UFSM, 8(3), 329-341. Recuperado de <https://periodicos.ufsm.br/revistadireito/article/view/8280> DOI: 10.5902/19813694.. 2013.

BRASIL. IBGE. **Censo Agropecuário, 2017.** Disponível em: <https://censos.ibge.gov.br/agro/2017>. Acessado em 2 dez. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Estimativa 2018:** Incidência de Câncer no Brasil. INCA - Instituto Nacional de Câncer José Gomes da Silva. Rio de Janeiro, RJ, 2018.

BRASIL. **Posicionamento do Instituto Nacional do Câncer acerca dos agrotóxicos.** Ministério da Saúde. Disponível em: http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/comunicacao/posicionamento_do_inca_sobre_os_agrotoxicos_06_abr_15.pdf. Acessado em: 02 de abril de 2018.

BRASIL. Instituto Nacional De Câncer (INCA). **Estimativa 2018:** Incidência de Câncer no Brasil. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro: INCA. 2017.

BRASIL. **Registros hospitalares de câncer:** planejamento e gestão. Rio de Janeiro, RJ: INCA. 2010.

BRADBERRY S.M.; PROUDFOOT A.T.; VALE J.A. **Glyphosate poisoning. Toxicological Reviews.** [S.l.], v.23(3), p.159-167. 2004.

BOHRER, Luiz Carlos. **Diagnóstico de riscos no uso de herbicidas nas lavouras de soja no município de Cruz Alta.** RS. 2005.

BOMBARDINI, L. M. **Atlas: Geografia do Uso de Agrotóxicos no Brasil e Conexões com a União Européia.** Laboratório de Geografia Agrária FFLCH - USP, São Paulo. 2017.

BRUNTON LL, PARKER KL, editors. **Goodman & Gilman's: Manual of Pharmacology and Therapeutics.** McGraw Hill, 2008.

BUSATO, Maria Assunta et al. Uso e manuseio de agrotóxicos na produção de alimentos da agricultura familiar e sua relação com a saúde e o meio ambiente. **Holos**, v. 1, p. 1-9, 2019.

BUSSAB, W. O.; MORETTIN, P. A. Estatística básica (basic statistics). São Paulo (SP): Saraiva, p. 557, 2010.

CAPDEVILA JH, FALCK JR, IMIG JD. Roles of the cytochrome P450 arachidonic acid monooxygenases in the control of systemic blood pressure and experimental hypertension. *Kidney Int* 2007; 72:683–689.

CASAL, V. B., AZEVEDO, L. F., FERREIRA, R. P., SILVA, D. G., SIMÃO, R. S. Agrotóxicos: uma revisão de suas consequências para a saúde pública. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, 18(1), 437-445. Recuperado de <https://periodicos.ufsm.br/reget/article/view/12498/pdf>. DOI: 10.5902/22361170. 2014.

CAVALLI, V. L., CATTANI, D., HEINZ RIEG, C. E., PIEROZAN, P., ZANATTA, L., BENEDETTI PARISOTTO, E., et al. (2013). **Roundup disrupts male reproductive functions by triggering calcium-mediated cell death in rat testis and Sertoli cells.** *Free Radical Biology & Medicine*, 65, 335–346. doi:10.1016/j.free radbiomed.2013.06.043.

CHEN, R. Z, PETERSSON U, BEARD, C, JACKSON-GRUSBY, L, JAENISCH, R. **DNA hypomethylation leads to elevated mutation rates.** Nature, 395: 89–93. 1998.

CLAPP, R. W. **Mortality among US employees of a large computer manufacturing company: 1969-2001.** Environmental Health, London, 5:30. 2006.

CLARO, S.A.; PAGANELLA, F. Circular da EMATER. 2000.YAMAORI, Satoshi; KOEDA, Kyoko; KUSHIHARA, Mika; HADA, Yui; YAMAMOTO, Ikuo; WATANABE, Kazuhito (1 January 2012). "**Comparison in the In Vitro Inhibitory Effects of Major Phytocannabinoids and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Contained in Marijuana Smoke on Cytochrome P450 2C9 Activity**". Drug Metabolism and Pharmacokinetics. 27 (3): 294–300.

COLLOTTA, M., BERTAZZI, P.A, BOLLATI, V. **Epigenetics and pesticides.** Toxicology, v. 307, p. 35-41. 2013.

CONTI, C. L., BARBOSA, W. M., SIMÃO, J. B. P., ÁLVARES-DA-SILVA, A. M. **Pesticide exposure, tobacco use, poor self-perceived health and presence of chronic disease are determinants of depressive symptoms among coffee growers from Southeast Brazil.** Psychiatry research, v. 260, p. 187-192, 2018.

DALLEGRAVE, E.; MANTESE, F.D.; OLIVEIRA, R.T.; ANDRADE, A.J.M.; DALSENER, P.R.; LSANGELOH, **A.Pre- and postnatal toxicity of the commercial glyphosate formulation in Wistar rats.** Arch. Toxicol. 81: 665-673, 2007.

DALY, A., RETTIE, A., FOWLER, D., & MINERS, J. Pharmacogenomics of CYP2C9: functional and clinical considerations. **Journal of personalized medicine**, 8(1), 1. 2017.

DE ROOS, A. J., BLAIR, A., RUSIECKI, J. A., HOPPIN, J. A., SVEC, M., DOSEMECI, M. & ALAVANJA, M. C. **Cancer incidence among glyphosate-exposed pesticide applicators in the Agricultural Health Study.** Environmental health perspectives, 113(1), 49-54. 2005.

DIAS, Ana Carolina Rodrigues. Interação entre o óxido nítrico e a ativação de neurônios glutamatérgicos no núcleo de tracto solitário sobre o controle cardiovascular. 2003.

DONNER KM, HILTUNEN TP, SUONSYRJA T, HANNILA-HANDELBERG T, TIKKANEN I, ANTIKAINEN M, et al. CYP2C9 genotype modifies activity of the reninangiotensin-aldosterone system in hypertensive men. J Hypertens 2009; 27:2001–2009.

ELMADANI, M. F., MOUSTAFA, Y. M., EL-AZAB, M. F., & PELKONEN, O. **Investigation of Mechanism Based Inhibition of Cyp450 Enzymes by Selected Organophosphorous, Pyrethroids and Benzoyl Urea Pesticides in Pooled Human Liver Microsomes.** Therapeutics, Pharmacology & Clinical Toxicology,

15(3). 2011.

ENAYETALLAH AE, FRENCH RA, BARBER M, GRANT DF. Cell-specific subcellular localization of soluble epoxide hydrolase in human tissues. *J Histochem Cytochem* 2006; 54:329–335.

EPAGRI -- Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina. **Síntese Anual da Agricultura de Santa Catarina 2014-2015**. Florianópolis: Autor. Recuperado de http://docweb.epagri.sc.gov.br/website_cepa/publicacoes/Sintese_2015.pdf. 2015.

EMPRESA Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Uso de agrotóxicos: Normas gerais para o uso de agrotóxicos**. Recuperado de <https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Banana/BananaJuazeiro/agrotoxicos.htm>. 2003.

FAREED, M., PATHAK, M. K., BIHARI, V., KAMAL, R., SRIVASTAVA, A. K., & KESAVACHANDRAN, C. N. **Adverse respiratory health and hematological alterations among agricultural workers occupationally exposed to organophosphate pesticides: a cross-sectional study in North India**. *PLoS One*, 8(7), e69755. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0069755>. 2013.

FLEMING, I. (2014). "The pharmacology of the cytochrome P450 epoxigenase/soluble epoxide hydrolase axis in the vasculature and cardiovascular disease". *Pharmacol. Rev.* 66 (4): 1106–40.

FREEMAN GH, HALTON JH. *Biometrika*. 1951 Jun;38(1-2):141-9. Note on an exact treatment of contingency, goodness of fit and other problems of significance.

FUKUWATARI, T.; SHIBATA, K. **Nutritional Aspect of Tryptophan Metabolism**. *Int. J. Tryptophan. Res.* 2013, 6, 3–8.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. **Nota Técnica - Reavaliação toxicológica do ingrediente ativo glifosato**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária Gerência Geral de Toxicologia. Anvisa - Ministério da Saúde. Nota Técnica nº 23, 2018.

FURLONG, M., TANNER, C. M., GOLDMAN, S. M., BHUDHIKANOK, G. S., BLAIR, A., CHADE, A. & LANGSTON, J. W. **Protective glove use and hygiene habits modify the associations of specific pesticides with Parkinson's disease**. *Environment international*, 75, 144-150. <http://doi.org/10.1016/j.envint.2014.11.002>. 2015.

GASNIER, Céline *et al.* **Dig1 protects against cell death provoked by glyphosate-based herbicides in human liver cell lines**. *Journal of occupational medicine and toxicology*, v. 5, n. 1, p. 29, 2010.

GHANIZADEH, A. **Increased glutamate and homocysteine and decreased glutamine levels in autism: A review and strategies for future studies of amino acids in autism**. *Dis Markers* 2013;35:281.

GOMES, M. A. F., BARIZON, R. R. M. **Panorama da Contaminação Ambiental por Agrotóxicos e Nitrato de origem Agrícola no Brasil: Cenário 1992/2011.** Jaguariúna, SP: Embrapa. Recuperado de <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/987245/1/Doc98.pdf>. 2014.

GRESS, Steeve et al. **Glyphosate-based herbicides potentially affect cardiovascular system in mammals: review of the literature.** Cardiovascular toxicology, v. 15, n. 2, p. 117-126, 2015.

GUNATILAKE, Sarath; SENEFF, Stephanie; ORLANDO, Laura. **Glyphosate's synergistic toxicity in combination with other factors as a cause of chronic kidney disease of unknown origin.** International journal of environmental research and public health, v. 16, n. 15, p. 2734, 2019.

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

HANG, HP; DALE, MM; RITTER, JM; MOORE, PK. **Farmacologia.** 5 ed. São Paulo: Elsevier; 2003.

HE, X., & FENG, S. **Role of metabolic enzymes P450 (CYP) on activating procarcinogen and their polymorphisms on the risk of cancers.** Current drug metabolism, 16(10), 850-863. 2015.

HERTZ-PICCIOTTO, I., SASS, J., ENGEL, S., BENNETT, D., BRADMAN, A., ESKENAZI, B., LANPHAR B., WHYATT, R. **Organophosphate exposures during pregnancy and child neurodevelopment: Recommendations for essential policy reforms.** Disponível em: <https://journals.plos.org/plosmedicine/article?id=10.1371/journal.pmed.1002671>. Acesso em 3 dez. 2019.

HIETANEN, E.; LINNAINMAA, K.; VAINIO, H. **Effects of phenoxyherbicides and glyphosate on the hepatic and intestinal biotransformation activities in the rat.** Acta Pharmacol. Toxicol. (Copenh) 1983, 53, 103–112.

HOY. J., SWANSON, N.; SENEFF, S. **The high cost of pesticides: human and animal diseases.** Poultry Fisheries Wildlife Sci. 3 (2015) 1.

IBAMA. **Relatórios de comercialização de agrotóxicos.** Disponível em: <[http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios de comercializacao de grotoxicos](http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios_de_comercializacao_de_grotoxicos)>. Acessado em: 17 de abril de 2018.

IBGE. **Indicadores de desenvolvimento sustentável: Brasil, 2015 / IBGE, Coordenação de Recursos Naturais e Estudos Ambientais [e] Coordenação de Geografia. – Rio de Janeiro : IBGE, 352p. 2015.**

INGELMAN-SUNDBERG M, Sim SC, Gomez A, Rodriguez-Antona C. **Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: pharmacogenetic, pharmacoepigenetic and clinical aspects.** Pharmacol Ther. 2007 Dec; 116(3):496-

526.

ITO, Y.; KONDO, H.; GOLDFARB, PS.; LEWIS, DF. **Analysis of CYP2D6 substrate interactions by computational methods.** J Mol Graph Model. 2008 Feb;26(6):947-56.

JOBIM, P. F. C., NUNES, L. N., GIUGLIANII, R., DA CRUZ I. B. M. **Is there an association between cancer mortality and agrototoxic use?** A contribution to the debate. Cien Saude Colet, v. 15, n. 1, p. 277-88. 2010.

JUNGMANN, G. **Arsenic cancer in vintagers.** Landarzt 42 (28), 1244–1247. 1966.

KABAT, Geoffrey. **IARC's Glyphosategate Scandal.** Disponível em: <https://www.forbes.com/sites/geoffreykabat/2017/10/23/iarcs-glyphosate-gate-scandal/#5c0260de1abd>. Acessado em 2 dez 2019.

KIM, K.Y., KIM, D.S., LEE, S.K., LEE, I.K., KANG, J.H., CHANG, Y.S., JACOBS, D.R., STEFFES, M., LEE, D.H. **Association of low-dose exposure to persistent organic pollutants with global DNA hypomethylation in healthy Koreans.** Environ. Health Perspect. 118, 370–374. 2010.

KIM MJ, Huang SM, Meyer UA, Rahman A, Lesko LJ. **A regulatory science perspective on warfarin therapy: a pharmacogenetic opportunity.** J Clin Pharmacol. 2009 Feb;49(2):138-46.

Kirchheiner J, Brockmöller J. **Clinical consequences of cytochrome P450 2C9 polymorphisms.** Clin Pharmacol Ther. 2005 Jan;77(1):1-16. Review.

KINNER, M., KUBSAD, D., NILSSON, E., KING, S., SADLER-RIGGLEMAN, I., BECK, D. **Assessment of Glyphosate Induced Epigenetic Transgenerational Inheritance of Pathologies and Sperm Epimutations: Generational Toxicology.** Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-019-42860-0>. Acessado em 2 dez. 2019.

KING, B. P., KHAN, T. I., AITHAL, G. P., KAMALI, F., & DALY, A. K. **Upstream and coding region CYP2C9 polymorphisms: correlation with warfarin dose and metabolism.** Pharmacogenetics and Genomics, 14(12), 813-822. 2004.

KITCHEN, L.M.; WITT, W.W.; RIECK, C.E. **Inhibition of δ -aminolevulinic acid synthesis by glyphosate.** Weed Sci. 1981, 29, 571–577.

KONKEL, A; SCHUNCK, W. H. (2011). **"Role of cytochrome P450 enzymes in the bioactivation of polyunsaturated fatty acids"**. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics. 1814 (1): 210–22.

KRAJINOVIC, M., LABUDA, D., RICHER, C., KARIMI, S., & SINNETT, D. **Susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia: influence of CYP1A1, CYP2D6, GSTM1, and GSTT1 genetic polymorphisms.** Blood, 93(5), 1496-1501. 1999.

KRÜGER, M.; SCHRÖDL, W.; NEUHAUSJ, S. **Field investigations of glyphosate**

in urine of Danish dairy cows. J Environ Anal Toxicol 2013;3:1-7.

KUMAR, D., PANT, M. C., PARMAR, D., SINGH, S., & BRAHMABHATT, M. Study on association of polymorphism of CYP450 2D6 with head and neck cancer and treatment response in patients receiving neoadjuvant chemotherapy paclitaxel, cisplatin, 5fu (TPF) followed by chemoradiation. **International Journal of Research in Medical Sciences**, 2(2), 585-591. 2014.

LEE, W., COLT, J., HEINEMAN, E., MCCOMB, R., WEISENBURGER, D., LIJINSKY, W., WARD, M. **Agricultural pesticide use and risk of glioma in Nebraska, United States.** Occupational and Environmental Medicine, London, v. 62, n. 11, p. 786-792. 2005.

LICLICAN EL, DOUMAD AB, WANG J, LI J, FALCK JR, STIER CT Jr, et al. Inhibition of the adenosine2A receptor-epoxyeicosatrienoic acid pathway renders Dahl salt-resistant rats hypertensive. Hypertension 2009; 54:1284–1290.

LONDRES, F. **Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida.** Rio de Janeiro: Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa. Recuperado de <https://contraosagrototoxicos.org/wp-content/uploads/2016/12/Agrototoxicos-no-BrasilINTERNET.pdf>. 2011.

LYNCH T, Price A. **The effect of cytochrome P450 metabolism on drug response, interactions, and adverse effects.** Am Fam Physician. 2007 Aug; 1;76(3):391-6.

MAKITA K, TAKAHASHI K, KARARA A, JACOBSON HR, FALCK JR, CAPDEVILA JH. Experimental and/or genetically controlled alterations of the renal microsomal cytochrome P450 epoxygenase induce hypertension in rats fed a high salt diet. J Clin Invest 1994; 94:2414–2420.

MARCOLIN, M. A.; CANTARELLI, M. da G.; GARCIA JUNIOR, M. **Interações farmacológicas entre medicações clínicas e psiquiátricas.** Archives of Clinical Psychiatry (São Paulo), v. 31, n. 2, p. 70-81, 2004.

MARTINUS, C.; FEITERS, Alan E. **Rowan and Roeland J. M. Nolte. From simple to supramolecular cytochrome P450 mimics.** Chem Soc Rev. 2000 29, 375–384

MASCARENHA, F., PESSOA, Y. S. R. Q. **Aspectos que potencializam a contaminação do trabalhador rural com agrotóxicos: uma revisão integrativa.** Trabalho e Educação, 22(2): 87-103. 2013.

MCDUFFIE, H. H., PAHWA, P., MCLAUGHLIN, J. R., SPINELLI, J. J., FINCHAM, S., DOSMAN, J. A., ... & CHOI, N. W. **Non-Hodgkin's lymphoma and specific pesticide exposures in men: cross-Canada study of pesticides and health.** Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers, 10(11), 1155-1163. 2001.

MCLAREN, PJ; Cave, JG; Parker, EM; Slocombe, RF. **Chondrodysplastic calves in Northeast Victoria.** Vet Pathol 2007;44:34254.

MENDONÇA, Cintia Franco Rodrigues. **Determinação de glifosato e AMPA nas águas superficiais da Bacia do Paraná 3**. 2018.

MENEGAT, R. P. & FONTANA, R. T. Condições de trabalho do trabalhador rural e sua interface com o risco de adoecimento. **Ciência, Cuidado e Saúde**. 9(1), 52-59. <http://doi.org/10.4025/cienccuidsaude.v9i1.7810>. 2010.

MESNAGE, R., ARNO, M., COSTANZO, M., MALATESTA, M., SÉRALINI, G. E., & ANTONIOU, M. N. **Transcriptome profile analysis reflects rat liver and kidney damage following chronic ultra-low dose Roundup exposure**. *Environmental Health*, 14(1), 70. 2015.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Hiperplasia adrenal congênita (HAC) ou hiperplasia congênita da supra-renal. 28 de jun. de 2017. Disponível em: <<https://www.saude.gov.br/acoes-e-programas/programa-nacional-da-triagem-neonatal/hiperplasia-adrenal-congenita-hac>>. Acesso em: 04/02/2020.

MIRANDA FILHO, A., L. **Mortalidade por neoplasias potencialmente associadas à atividade agrícola no estado do Rio de Janeiro**. Dissertação (Mestrado) – Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro. 2012.

MIRANDA, N. M. Evidências dos efeitos dos agrotóxicos na carcinogênese. **Revista da Graduação**, 8(1). 2015.

MOTTA, E., RAYMANN, K., MORAN, N. **Glyphosate perturbs the gut microbiota of honey bees**. Disponível em: <https://www.pnas.org/content/early/2018/09/18/1803880115?versioned=true>. Acessado em 3 dez. 2019.

MORIN, Pâmela Vione; STUMM, Eniva Miladi Fernandes. **Transtornos mentais comuns em agricultores, relação com agrotóxicos, sintomas físicos e doenças preexistentes**. *Psico*, v. 49, n. 2, p. 196-205, 2018.

MURPHY, E. S., LEYRER, C.M., PARSONS, M., SUH, J.H., CHAO, S.T., YU, J.S., KOTECHA, R., JIA, X., PEEREBOOM, D.M., PRAYSON, R.A., STEVENS, G.H..J., BARNETT, G.H., VOGELBAUM, M.A., AHLUWALIA, M.S. Factors for Malignant Transformation of Low Grade Glioma. **International Journal of Radiation Oncology**, V. 100(4), p. 965–971. 2018.

MIRANDA FILHO, A., L., MEYER, A., MONTEIRO, G., T., R. **Validation of underlying cause of death in selected neoplasms in Serrana microregion**, Rio de Janeiro, *Cad. saúde colet.* vol.22 no.3, Rio de Janeiro July/Sept, Brazil. 2014.

NATARAJAN R, Reddy MA. HETEs/EETs in renal glomerular and epithelial cell functions. *Curr Opin Pharmacol* 2003; 3:198–203.

NAPOLI, E.; WONG, S.; GIULIVI, C. **Evidence of reactive oxygen species mediated damage to mitochondrial DNA in children with typical autism**. *Mol*

Autism 2013;4:2.

NCBI. Results for variants in the **CYP2C9** gene. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/?term=CYP2C9%5Bgene%5D>>. Acesso em: 07/02/2020.

NEVE, EP.; INGELMAN-SUNDBERG, M. **Intracellular transport and localization of microsomal cytochrome P450**. Anal Bioanal Chem. 2008 Nov;392(6):1075-84. Epub 2008 Jun 8.

NEVES CRUZ, Jorddy; DA COSTA, Kauê Santana; de Carvalho, Tarcísio André Amorim; de Alencar, Nelson Alberto Nascimento (14 de abril de 2019). «Measuring the structural impact of mutations on cytochrome P450 21A2, the major steroid 21-hydroxylase related to congenital adrenal hyperplasia». Journal of Biomolecular Structure and Dynamics (em inglês): 1–10. ISSN 0739-1102. doi:10.1080/07391102.2019.1607560.

NICHOLS, L.; SORAHAN, T. **Cancer incidence and cancer mortality in a cohort of UK semiconductor workers, 1970-2002**. Occupational Medicine, London, v. 55, n. 8, p. 625- 630. 2005.

PARA - Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA:** Autor. Recuperado de <http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia/Assuntos+de+Interesse/Programa+de+Analise+de+Residuos+de+Agrotoxicos+em+Alimentos>. 2011.

PASDOIS, P., QUINLAN, C. L., RISSA, A., TARIOSSE, L., VINASSA, B., COSTA, A. D. T., et al. **Ouabain protects rat hearts against ischemia-reperfusion injury via pathway involving src kinase, mitoKATP, and ROS**. American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology, 292(3), H1470–H1478. doi:10.1152/ajpheart.00877.2006.

OLORUNSOGO, O. O. (1990). **Modification of the transport of protons and Ca²⁺ ions across mitochondrial coupling membrane by N-(phosphonomethyl)glycine**. Toxicology, 61(2), 205–209.
PESTICIDE ACTION NETWORK. **Glyphosate fact sheet**. Pesticides News. [S.l.], n.33, p.28-29. 1996. Disponível em: . Acesso em: 01 de junho de 2010.

PIGNATI, W. A.; LIMA, F. A. N. S.; DE LARA, S. M.; CORREA, M. L. M.; BARBOSA, J. R.; LEÃO, L. H. C.; PIGNATTI, M. F. Spatial distribution of pesticide use in Brazil: a strategy for Health Surveillance. **Ciência & Saúde Coletiva**, 22(10):3281-3293. 2017.

PRADO, Carolina Martins do. **Desenvolvimento de metodologia para a determinação dos genótipos principais dos genes CYP2D6, CYP2C19 e CYP2C9: aplicação na Farmacogenética**. São Paulo, Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia. 2009.

PTDRSS. **Plano Territorial de Desenvolvimento Rural Sustentável e Solidário do Portal do Sertão**, Feira de Santana – BA, CODETER Portal do Sertão, UFRB, 2017.

POOLSUP N, Li Wan Po A, Knight TL. **Pharmacogenetics and psychopharmacotherapy**. J Clin Pharm Ther. 2000 Jun;25(3):197-220.

REMONTET, L., ESTÈV, L., BOUVIER, A. M, GROSCLAUDE, P., LAUNOY, G., MENEGOZ, F., EXBRAYAT. C. **Cancer incidence and mortality in France over the period 1978-2000**, Revue d'Epidémiologie et de Santé Publique, Vol 51, n. 1, février, p. 3-30. 2003.

RICHARD S., MOSLEMI S., SIPAHUTAR H., BENACHOUR N., SERALINI G-E. **Differential effects of glyphosate and roundup on human placental cells and aromatase**. Environ Health Perspect. [S.l.],v.113, n.6, p.:716-20. 2005. Disponível em: . Acesso em: novembro de 2019.

RODGERS, K.J; SHIOZAWA, N. **Misincorporation of amino acid analogues into proteins by biosynthesis**. Intl J. Biochem. Cell Biol. 40 (2008) 1452–1466.

RODGERS, K.J.; WANG, H.; FU, S.; DEAN, R.T. Biosynthetic incorporation of oxidized amino acids into proteins and their cellular proteolysis. Free Radical Biol. Med. 32 (2002) 766–775.

RODRIGUEZ CETINA BIEFER, H.; VASUDEVAN, A.; ELKHAL, A. **Aspects of tryptophan and nicotinamide adenine dinucleotide in immunity: A new twist in an old tale**. Int. J. Tryptophan. Res. 2017.

ROGERS JF, NAFZIGER AN, Bertino JS Jr. Pharmacogenetics affects dosing, efficacy, and toxicity of cytochrome P450-metabolized drugs. Am J Med. 2002 Dec; 15;113(9):746-50.

ROTH, F. **Über den Bronchialkrebs Arsengeschiedigter Winzer**. Virchows Arch. 331 (119–137). 1958.

ROSSIGNOL, DA.; Frye, RE. **Mitochondrial dysfunction in autism spectrum disorders: A systematic review and meta analysis**. Mol Psychiatry 2012;17:290 314.

ROSSIGNOL, DA, Frye RE. **Evidence linking oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and inflammation in the brain of individuals with autism**. Front Physiol 2014;22:150.

ROTHSTEIN, M.A, HARRELL, H.L, MARCHANT, G.E. **Transgenerational epigenetics and environmental justice**. Environ Epigenet. 2017.

RUBENSTEIN, E. **Biologic effects of and clinical disorders caused by nonprotein amino acids**. Medicine 79 (2000) 80–89.

SAMSEL, A.; SENEFF, S. **Glyphosate, pathways to modern diseases II: Celiac sprue and gluten intolerance**. Interdisciplinary toxicology, 6(4), 159-184. 2013a.

SAMSEL, Anthony; SENEFF, Stephanie. **Glyphosate pathways to modern diseases V: Amino acid analogue of glycine in diverse proteins.** Journal of Biological Physics and Chemistry, v. 16, p. 9-46, 2016.

SAMSEL, A., & SENEFF, S. **Glyphosate's suppression of cytochrome P450 enzymes and amino acid biosynthesis by the gut microbiome: pathways to modern diseases.** Entropy, 15(4), 1416-1463. 2013b.

SAMSEL, A., & SENEFF, S. **Glyphosate, pathways to modern diseases IV: cancer and related pathologies.** J. Biol. Phys. Chem, 15, 121-159. 2015.

SENEFF S, LAURITZEN A, DAVIDSON RM, LENTZMARINO L. **Is encephalopathy a mechanism to renew sulfate in autism?** Entropy 2013;15:372406.

SCHEREINEMACHERES, P., TIPRAQSA, P. **Agricultural pesticides and land use intensification in high, middle and low income countries.** Food Policy, v. 37, n. 6, p. 616-626. 2012.

SEBASTIANY, C.A. **Diagnóstico de riscos no uso de dessecantes no Município de Pirapó/RS.** Monografia de Especialização em Engenharia de Segurança do Trabalho – Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria: UFSM, 2001.

SEILER, N. **Ammonia and Alzheimers disease.** Neurochem Int 2002;41:189207

SEKHOTHA, M. M., MONYEKI, K. D., & SIBUYI, M. E. **Exposure to agrochemicals and cardiovascular disease: a review.** International journal of environmental research and public health, 13(2), 229. <http://doi.org/10.3390/ijerph13020229>. 2016.

SINGH, A. **Pharmacogenomics--the potential of genetically guided prescribing.** Aust Fam Physician. 2007 Oct;36(10):820-4.

SHIMMURA, C.; SUDA, S.; TSUCHIYA, KJ.; HASHIMOTO, K.; OHNO, K.; MATSUZAKI, H *et al.* **Alteration of plasma glutamate and glutamine levels in children with high functioning autism.** PLoS ONE 2011;6:e25340.

SUAREZ-LOPEZ, J. HOOD, N., SUÁREZ-TORRES, J., GAHAGAN, S., GUNNAR, M., LÓPEZ-PAREDES, D. **Associations of acetylcholinesterase activity with depression and anxiety symptoms among adolescents growing up near pesticide spray sites.** Disponível em: <https://sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1438463919301178>. Acessado em 2 dez. 2019.

SWANSON, N. L., LEU, A., ABRAHAMSON, J., & WALLET, B. **Genetically engineered crops, glyphosate and the deterioration of health in the United States of America.** Journal of Organic Systems, 9(2), 6-37. 2014.

SWERDLOW, RH; BURNS, JM; KHAN, SM. **The Alzheimer's disease mitochondrial cascade hypothesis.** J Alzheimers Dis 2010;20(Suppl 2):26579.

SYED, K.; MASHELE, S.S. **Comparative analysis of P450 signature motifs EXXR and CXG in the large and diverse kingdom of fungi: Identification of evolutionarily conserved amino acid patterns characteristic of P450 family.** PLoS ONE 2014, 9, e95616.

TARONE, Robert. **On the International Agency for Research on Cancer classification of glyphosate as a probable human carcinogen.** Disponível em: <http://europepmc.org/article/med/27552246>. Acessado em 2 dez. 2019.

THIERS, H., COLOMB, D., MOULIN, G., COLIN, L. **Arsenical skin cancer in vineyards in the Beaulonais (Fr.).** Ann. Dermatol. 94, 133–158. 1967.

THUNDIYIL, JOSEF G. et al. **Acute pesticide poisoning: a proposed classification tool.** Bulletin of the World Health Organization, v. 86, p. 205-209, 2008.

TIMOFEEVA, M. N., KROPP, S., SAUTER, W., BECKMANN, L., ROSENBERGER, A., ILLIG, T., ...& BARTSCH, H. **CYP450 polymorphisms as risk factors for early-onset lung cancer: gender-specific differences.** Carcinogenesis, 30(7), 1161-1169. 2009.

TOMALIK-SCHARTE D, Lazar A, FUHR U, Kirchheiner J. **The clinical role of genetic polymorphisms in drug-metabolizing enzymes.** Pharmacogenomics J. 2008 Feb;8(1):4-15.

VAN DER PLAAT, D., A, DE JONG, K., DE VRIES M, VAN DIEMEN, C.C., AMIN, N., KROMHOUT, H., VERMEULEN. R., POSTMA, D.S, VAN DUIJN, C.M, BOEZEN, H.M, VONK, J.M. **Occupational exposure to pesticides is associated with differential DNA methylation.** Occup Environ Med. 2018.

VAN MAELE-FABRY, G.; LANTIN, A. C.; HOET, P.; LISON, D. **Residential exposure to pesticides and childhood leukaemia: A systematic review and meta-analysis.** Environment International 37, 280–291. 2011.

VAZQUEZ, M. A., MATURANO, E., ETCHEGOYEN, A., DIFILIPPO, F. S., & MACLEAN, B. **Association between cancer and environmental exposure to glyphosate.** International Journal of Clinical Medicine, 8(02), 73. 2017.

WAGNER, Karen; VITO, Steve; INCEOGLU, Bora; HAMMOCK, Bruce D. (2014). **"The role of long chain fatty acids and their epoxide metabolites in nociceptive signaling"**. Prostaglandins Other Lipid Mediat. 113-115: 2–12.

WEICHENTHAL, S., MOASE, C., CHAN, P. **A review of pesticide exposure and cancer incidence in the Agricultural Health Study cohort.** Environ. Health Perspect. 118 (8), 1117–1125. 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. **WHO methods and data sources for country-level causes of death 2000-2016.** Global Health Estimates Technical Paper WHO/HIS/IER/GHE/2018.3; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2018.

Yao, J.; Irwin, RW.; Zhao, L.; Nilsen, J.; Hamilton, RT.; Brinton, RD. **Mitochondrial bioenergetic deficit precedes Alzheimer's pathology in female mouse model of Alzheimer's disease.** Proc Natl Acad Sci USA 2009;106:146705.

ZANGER,UM;TURPEINEN,M;KLEIN,K;SCHWAB,M. **Functional pharmacogenetics/genomics of human cytochromes P450 involved in drug 131 biotransformation.** Anal Bioanal Chem. 2008 Nov;392(6):1093-108. Epub 2008 Aug 10.

ZHAO, Q.; MODI, S.; SMITH, G.; PAINE, M.; MCDONAGH, P.D.; WOLF, C.R.; TEW, D.; LIAN, L.Y.; ROBERTS, G.C.; DRIESSEN, H.P. **Crystal structure of the FMN-binding domain of human cytochrome P450 reductase at 1.93 Å resolution.** Protein Sci. 1999, 8, 298–306.

ZHAO X, Pollock DM, Zeldin DC, Imig JD. Salt-sensitive hypertension after exposure to angiotensin is associated with inability to upregulate renal epoxygenases. Hypertension 2003; 42:775–780.

ZHOU SF, Di YM, Chan E, Du YM, Chow VD, Xue CC, Lai X, Wang JC, Li CG, Tian M, Duan W **Clinical pharmacogenetics and potential application in personalized medicine.** Curr Drug Metab. 2008 Oct; 9(8):738-84.

ANEXOS

ANEXO I



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

QUESTIONÁRIO

**POLIMORFISMO DE *CYP2C9*: ESTUDO DA RELAÇÃO DO USO DE
AGROTÓXICOS COM O DESENVOLVIMENTO DE DOENÇAS EM
AGRICULTORES DO ESPÍRITO SANTO**

1. Nome:_____.

2. Localidade:_____.

3. Telefone:_____.

4. Data de nascimento:_____.

5. Idade:_____.

6. Sexo:_____.

7. Tempo como agricultor:_____.

8. Usa agrotóxicos na Lavoura?_____.

9. Se sim, quais?

10. Fumante?

- () Nunca fumou;
() Já fumou e não fuma atualmente;
() Fuma atualmente.

11. Consume bebida alcoólica?

- Nunca bebeu;
 Já bebeu no passado e atualmente não bebe;
 Bebe atualmente.

12. Apresenta ou já apresentou algum desses sintomas abaixo?

- Irritação ocular: sim não
Lesões na pele/Alergias: sim não
Queimaduras na pele: sim não
Náuseas/ânsia de vômito: sim não
Catarro: sim não
Dor abdominal: sim não
Diarréia: sim não
Digestão difícil: sim não
Chiados sibilos: sim não
Asma: sim não
Inflamações gástricas: sim não
Doenças hepáticas: sim não
Alterações na pressão arterial: sim não
Infertilidade: sim não
Lacrimejamento: sim não
Tonturas/Vertigens: sim não
Tosse: sim não
Falta de ar/Dispnéia: sim não
Visão turva: sim não
Tremores: sim não
Vômitos: sim não
Dor nas articulações: sim não
Hepatite: sim não
Artrose/Osteoporose: sim não
Doenças renais: sim não
Doenças respiratórias: sim não
Déficit de atenção: sim não
Abortamentos: sim não
Dor de cabeça: sim não

- Suor excessivo: () sim () não
- Salivação: () sim () não
- Agitação/Irritabilidade: () sim () não
- Formigamento: () sim () não
- Miose: () sim () não
- Câimbras: () sim () não
- Dor no corpo/Musculatura: () sim () não
- Depressão: () sim () não
- Doenças cardiovasculares: () sim () não
- Câncer: () sim () não
- Palpitação cardíaca: () sim () não
- Lesão em glândulas salivares: () sim () não
- Malformação: () sim () não
- Hiperatividade: () sim () não

ANEXO II

PROTOCOLO DE SEGURANÇA NA MANIPULAÇÃO DE AGROTÓXICOS

1 – MEDIDAS DE PROTEÇÃO PESSOAL:

- ✓Proteção dos olhos: óculos de segurança ou viseira.
- ✓Proteção da pele: macacão ou calça e camiseta de mangas compridas, luvas para proteção química e sapato de segurança.
- ✓Proteção respiratória: máscara contra particulados (poeira total).

2 – PRIMEIROS SOCORROS:

Muito importante: em com a pele o produto pode causar irritação com ardência, vermelhidão e coceira. Em caso de contato com os olhos, o produto pode causar lesões graves. Em caso de ingestão pode causar irritação do trato gastrointestinal, náusea, vômito, diarreia. Se inalado pode causar irritação do trato respiratório superior, edema pulmonar e dificuldade respiratória. Nos casos mais graves de intoxicação, pode ocorrer: redução da quantidade de urina, aumento da temperatura corporal.

- ✓Procure logo um serviço médico de emergência levando a embalagem, rótulo, bula e/ou receituário agrônomo do produto.
- ✓Ingestão: se engolir o produto, não provoque vômito. Caso o vômito ocorra naturalmente, deite a pessoa de lado. Não dê nada para beber ou comer.
- ✓Olhos: em caso de contato, lave com muita água corrente durante pelo menos 15 minutos. Evite que a água de lavagem entre no outro olho.
- ✓Pele: em caso de contato, tire a roupa contaminada e lave a pele com muita água corrente e sabão neutro. Inalação: se o produto for inalado (“respirado”), leve a pessoa para um local aberto e ventilado.
- ✓A pessoa que ajudar deveria proteger-se da contaminação usando luvas e avental impermeáveis, por exemplo.

3-INSTRUÇÕES EM CASO DE ACIDENTES:

- ✓Isole e sinalize a área contaminada.

✓Contate as autoridades locais competentes e a Empresa responsável por fabricar o produto através do telefone de Emergência registrado na embalagem do produto.

✓Utilize Equipamento de Proteção Individual - EPI (macacão impermeável, luvas e botas de borracha, óculos protetor e máscara com filtros).

✓Em caso de derrame, siga as instruções abaixo:

Piso pavimentado: recolha o material com auxílio de uma pá e coloque em recipiente lacrado e identificado devidamente. O produto derramado não deverá mais ser utilizado.

Neste caso, consulte o registrante através do telefone indicado no rótulo para sua devolução e destinação final.

-Solo: retire as camadas de terra contaminada até atingir o solo não contaminado, recolha esse material e coloque em um recipiente lacrado e devidamente identificado. Contate a empresa registrante conforme indicado acima.

-Corpos d'água: interrompa imediatamente a captação para o consumo humano ou animal, contate o órgão ambiental mais próximo e o centro de emergência da empresa, visto que as medidas a serem adotadas dependem das proporções do acidente, das características do corpo hídrico em questão e da quantidade do produto envolvido.

✓Em caso de incêndio, use extintores DE ÁGUA EM FORMA DE NEBLINA, DE CO₂, PÓ QUÍMICO, ficando a favor do vento para evitar intoxicação.

4-PROCEDIMENTOS DE LAVAGEM, ARMAZENAMENTO, DEVOLUÇÃO, TRANSPORTE E DESTINAÇÃO DE EMBALAGENS VAZIAS E RESTOS DE PRODUTOS IMPRÓPRIOS PARA UTILIZAÇÃO OU EM DESUSO:

✓A EMBALAGEM NÃO PODE SER LAVADA.

✓ARMAZENAMENTO DA EMBALAGEM VAZIA: O armazenamento da embalagem vazia, até sua devolução pelo usuário, deve ser efetuado em local coberto, ventilado, ao abrigo de chuva e com piso impermeável, no próprio local onde guardadas as embalagens cheias. Use luvas no manuseio dessa embalagem. Essa embalagem vazia deve ser armazenada separadamente das lavadas, em saco plástico transparente (Embalagens Padronizadas - modelo ABNT), devidamente identificado e com lacre, o qual deverá ser adquirido nos Canais de Distribuição.

✓DEVOLUÇÃO DA EMBALAGEM VAZIA: No prazo de até um ano da data da

compra, é obrigatória a devolução da embalagem vazia, pelo usuário, ao estabelecimento onde foi adquirido o produto ou no local indicado na nota fiscal, emitida no ato da compra. Caso o produto não tenha sido totalmente utilizado nesse prazo, e ainda esteja dentro de seu prazo de validade, será facultada a devolução da embalagem em até 6 meses após o término do prazo de validade. O usuário deve guardar o comprovante de devolução para efeito de fiscalização, pelo prazo mínimo de um ano após a devolução da embalagem vazia.

✓TRANSPORTE: As embalagens vazias não podem ser transportadas junto com alimentos, bebidas, medicamentos, rações, animais e pessoas. Devem ser transportadas em saco plástico transparente (Embalagens Padronizadas - modelo ABNT), devidamente identificado e com lacre, o qual deverá ser adquirido nos Canais de Distribuição.

5-PRECAUÇÕES PARA O MANUSEIO SEGURO:

✓Utilize os Equipamentos de Proteção Individual (EPIs): óculos de segurança; macacão ou calça e camiseta de mangas compridas; luvas para proteção química; sapato de segurança; máscara contra poeira. NÃO manuseie o produto sem os EPIs recomendados ou se estiverem danificados. Evite contato com a pele, olhos e mucosas. Ao abrir a embalagem, faça-o de modo a evitar derramamentos. Manuseie o produto em local arejado e longe de qualquer fonte de ignição ou calor. Não fume. Assegure uma boa ventilação no local de trabalho. Manipule respeitando as regras gerais de segurança e higiene industrial. Leia e siga as instruções de uso recomendadas no rótulo. Observe o prazo de validade. Não reutilize a embalagem vazia. Não lave as embalagens em lagos, fontes, rios e demais corpos d'água. Não coma, beba ou fume durante o manuseio do produto. Lave-se após o manuseio, principalmente antes das refeições. Após o dia de trabalho, remova as roupas protetoras e tome banho.

6-PRECAUÇÕES PARA QUEM LAVA A ROUPA DOS AGRICULTORES:

✓Utilize pelo menos luvas para proteção química e avental impermeável.

7-ATENÇÃO:

✓Ligue para o Disque-Intoxicação (ANVISA): 0800-722-6001 para notificar o caso e obter informações especializadas sobre o diagnóstico e tratamento. A

ligação é gratuita e o usuário é atendido por uma das 36 unidades da Rede Nacional de Centros de Informação e Assistência Toxicológica (Renaciat).