Elza Midori Hashimoto

Estudo Cromossômico em Linfócitos de Aplicadores de Inseticidas



unesp

ELZA MIDORI HASHIMOTO

ESTUDO CROMOSSOMICO EM LINFOCITOS DE APLICADORES DE INSETICIDAS

Dissertação apresentada para obtenção do grau de **Mestre em Genética** no Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Area de Concentração em Genética, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista - UNESP.

São José do Rio Preto

1990

Inst. de Biociências, Letras e Ciências Exatas - UNESP
BIBLIOTECA
S. J. Rio Preto

T-516/91

ORIENTADORA: Profa. Dra. Marileila Varella Garcia

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Citogenética Humana e de Vertebrados, do Departamento de Biologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, da Universidade Estadual Paulista, UNESP, com auxílio-bolsa do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Dedico este trabalho
a meus pais, pelo carinho e confiança
aos meus irmãos, pela amizade e incentivo

"Pode-se viver no mundo uma vida magnífica, quando se sabe trabalhar e amar, trabalhar pelo que se ama e amar aquilo em que se trabalha".

TOLSTOI

"Fazer cada coisa a seu tempo, mas faze-la plenamente; todo trabalho inacabado fica por fazer, e sua lembrança pesa como um remorso... Todo trabalho terminado deixa no espírito um sentimento de alegria, de paz, e aumenta o vigor para um novo trabalho".

GABRIEL PALAU

INDICE

I. INTRODUÇÃO 1

I.1. Pesticidas: características, biotransformação e mecanismos de ação 1

I.2. Contaminação e intoxicação por pesticidas 8

I.3. Toxicidade dos pesticidas 13

I.4. Exposição ocupacional 19

I.5. Objetivos 20

II. MATERIAL E METODOS 22

II.1. Caracterização da amostra 22

II.2. Análise citogenética 27

II.3. Análise estatística 30

III. RESULTADOS 32

III.1. Aberrações cromossômicas 32

III.2. Trocas entre cromátides-irmãs 39

IV. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES 65

V. RESUMO 86

VI. SUMMARY 90

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS 93

VIII. AGRADECIMENTOS 104

I. INTRODUÇÃO

I.1. Pesticidas: características, biotransformação e mecanismos de ação.

Pesticidas, defensivos agrícolas, praguicidas e biocidas são diferentes denominações dadas a algumas substâncias químicas, naturais ou sintéticas, utilizadas para controlar ou combater as pragas. Estas, no sentido mais amplo, incluem todos os organismos que atacam, lesam ou transmitem enfermidades às plantas, aos animais e ao homem. A primeira referência a um agente pesticida data de 1874, quando OTHAMAR ZEIDLER sintetizou o 2,2-bis (p-clorofenil), 1,1,1-tricloetano, o DDT, um composto orgânico cujas propriedades inseticidas foram reveladas em 1939, por PAUL MULLER. Após a segunda guerra mundial, a indústria química teve um grande desenvolvimento e com ela desenvolveram-se também os pesticidas (ADDISON, 1982; ZAMBRONE, 1986).

Os pesticidas podem ser designados como fungicidas, herbicidas, inseticidas, nematocidas, rodenticidas ou outros, de acordo com os organimos vivos sobre o qual atuam. Os inseticidas são os principais agentes de intoxicação humana e uma extensa revisão sobre a caracterização química das classes de piretróides, organoclorados, organofosforados e carbamatos, assim como a ação tóxica e as manifestações clínicas decorrentes foi feita por MATSUMURA (1976) e LARINI (1987).

As piretrinas são ésteres extraídos de flores do gênero **Chrysanthemum** instáveis à luz e, portanto, sem efeitos residuais, que se constituem nos únicos inseticidas naturais empregados como

produtos domissanitários, mas não se prestando ao uso na agricultura. No entanto, atualmente já foram desenvolvidos novos tipos de piretrinas sintéticas, os piretróides, que são bastante estáveis ao ar, à luz e à umidade e, assim, adequados para uso agrícola. Exemplos de piretróides são aletrina, cismetrina, deltametrina e permetrina.

Os compostos organoclorados são hidrocarbonetos com um ou mais anéis aromáticos ou cíclicos saturados, que foram intensamente utilizados na agricultura, tais como aldrin, BHC, clordano, DDT e endosulfan. A ação desses compostos no ambiente é controlada por três de suas propriedades, ou seja, os compostos são relativamente insolúveis em água e solúveis em lipídios, têm apreciável pressão de vapor em temperatura ambiente e são muito estáveis, geralmente resistindo à degradação biológica ou abiótica. Entretanto, em determinadas condições, eles podem ser degradados por processos abióticos, tal como por fotólise ou por mecanismos catalisados por porfirina, desde que os resíduos permaneçam no ar, no sedimento ou no solo. Também podem ser degradados por processos biológicos, que geralmente envolvem conversão do material bruto solúvel em lipídios ou produtos conjugados para, dessa forma, serem mais facilmente excretados (ADDISON, 1982).

Os compostos organofosforados derivam dos ácidos fosfórico, tionofosfórico, ditionofosfórico, pirofosfórico e ditionopirofosfórico. São muito eficientes e são os mais utilizados comercialmente. Os que tem seus efeitos mais estudados são diclorvós, diazinon, malation e paration.

Os carbamatos ou compostos nitrogenados derivam do ácido

carbâmico, particularmente do ácido N-metilcarbâmico e são frequentemente empregados em residências, sendo responsáveis, muitas vezes, por acidentes toxicológicos graves. Os exemplos mais comuns nesta classe são aldicarb ou temik, carbaril e carbofuran.

As principais rotas de absorção dos pesticidas pelos mamíferos são as vias dérmica, digestiva e respiratória. Os piretróides são facilmente absorvidos pelos tratos digestivo e respiratório , e pouco absorvidos pela via dérmica, mas mesmo neste caso podem causar reações alérgicas.

Os compostos organoclorados são altamente lipossolúveis, portanto, são rápida e eficazmente absorvidos pelo trato digestivo, embora esse processo possa ocorrer também através das vias dérmica e respiratória. A absorção pela via respiratória ocorre, principalmente, em indivíduos que trabalham na aplicação dessas substâncias sob forma de pulverização ou nebulização.

A absorção de compostos organofosforados pela via digestiva ocorre em intoxicações acidentais, principalmente envolvendo crianças, em homicídios e em suicídios. A absorção por esta via também assume grande importância para as populações consumidoras de alimentos tratados com produtos de elevada toxicidade e que foram destinados ao consumo sem que tivesse decorrido o período de carência do inseticida. As vias dérmica e respiratória são as principais rotas de penetração nos indivíduos com ocupação agrícola, em trabalhadores das indústrias de formulação e no uso doméstico (LARINI, 1987).

Os carbamatos são pouco absorvidos pelos organismos humanos, principalmente se estiverem em formulações sólidas. A

absorção dérmica do composto carbaril, por exemplo, não é considerada importante no aparecimento de efeitos tóxicos em indivíduos que trabalham na produção industrial. No entanto, mesmo não ocorrendo os efeitos tóxicos após a absorção, a presença de produtos biotransformados na urina indica a absorção desses compostos por trabalhadores expostos (LARINI, 1987).

As substâncias xenobióticas, ou seja, aquelas que são estranhas aos organismos vivos, como é o caso dos pesticidas, podem passar por diferentes transformações após sua absorção, dependendo principalmente do grau de lipossolubilidade que apresentam. As substâncias pouco solúveis em lipídios, e portanto polares e ionizáveis em pH fisiológico, atravessam as membranas com certa dificuldade e são excretadas mais facilmente pelo rim. Contudo, são geralmente biotransformadas, formando produtos polares com pouca ou nenhuma atividade farmacológica ou tóxica. As substâncias solúveis em lipídios, por outro lado, atravessam as membranas orgânicas com muita facilidade e, embora sendo facilmente filtradas ao nível glomerular renal, são reabsorvidas pelos túbulos renais e assim permanecem no organismo. Estas substâncias passam, necessariamente, por um processo de biotransformação, também produzindo compostos polares frequentemente sem atividade farmacológica ou tóxica, ou facilmente excretados pelos rins, bilis, ar expirado, suor e saliva (LARINI & CECCHINI, 1987).

Portanto, a biotransformação é a principal responsável pela duração da ação e pela concentração sanguínea e tecidual dos xenobióticos. Esse tipo de transformação geralmente resulta na inativação do agente tóxico e, desse modo, o organismo defende-se

contra as ações tóxicas das substâncias . Entretanto, em alguns casos, a biotransformação de uma substância pode levar à formação de produtos ainda mais tóxicos, como é o caso do organofosforado paration, que sofre oxidação e se transforma em um produto mais tóxico, o paraoxon (BRITO FILHO, 1985).

Vários órgãos participam da biotransformação dos xenobióticos, sendo o fígado o principal envolvido nesse processo. Seu homogeneizado fornece frações contendo enzimas biotransformadoras, destacando-se entre elas as frações microssomal, mitocondrial e solúvel. A fração microssomal contém enzimas responsáveis pela maioria das reações de oxidação de xenobióticos, que estão localizadas no interior das células e encontram-se associadas ao retículo endoplasmático liso. Essas enzimas são envolvidas por uma membrana de natureza lipídica, e somente os xenobióticos com certo grau de lipossolubilidade conseguem entrar em contato com elas e serem biotransformados. A fração mitocondrial possui uma importante enzima, a monoamina-oxidase (MAO), que é responsável pela desaminação oxidativa de aminas biogênicas como serotonina, dopamina, tiramina e outras. A fração solúvel do hepatócito, assim como o plasma sanguíneo, contém inúmeras enzimas biotransformadoras, entre as quais encontram-se as esterases que degradam os ésteres, tais como a acetilcolina, as amidases responsáveis pela hidrólise de procainamida e as desidrogenases que atuam na oxidação de álcoois e aldeídos (LARINI & CECCHINI, 1987).

As reações de biotransformação podem ser agrupadas em quatro tipos principais: oxidação, redução, hidrólise (reações pré-sintéticas) e conjugação (reações sintéticas). Um composto pode

sofrer uma única reação; porém, na maioria das vezes, ocorrem reações sucessivas até a obtenção do produto final que é, geralmente, inativo e eliminado pelas vias normais.

A biotransformação dos piretróides é bastante complexa, sendo mais estudado o metabolismo dos compostos decametrina e permetrina em ratos. No metabolismo desses compostos, o grupamento vinil halogenado permanece intacto, enquanto que outras porções da molécula são susceptíveis ao ataque. A baixa toxicidade dos piretróides nos mamíferos é devida a reações de hidrólise (LARINI, 1987).

Os organoclorados, após a absorção, são distribuídos e concentrados nos tecidos gordurosos, principalmente do abdômen, no cérebro e no fígado. No fígado, são transformados através das enzimas existentes nos microssomos e nas mitocôndrias em produtos menos tóxicos ou inativos, que são eliminados pela urina, bílis, suor e leite. Porém, há algumas substâncias, como o heptacloro, que transformam-se em produtos mais tóxicos após a biotransformação, como o heptacloro epóxido (BRITO FILHO, 1985).

A biotransformação dos organofosforados ocorre principalmente por oxidação, hidrólise por esterases e transferência de porções da molécula para o glutatião. A maioria dos compostos tiofosfóricos, como o paration, é convertida em um produto biologicamente ativo, o paraoxon, por microssomos no fígado. A destoxificação dos organofosforados ocorre por modificações bioquímicas de suas estruturas ou por ligação em sítios sem significado toxicológico. Alguns organofosforados, como exemplo o malation, são metabolizados a produtos inativos mais rapidamente em

animais superiores do que em insetos e, consequentemente são menos danosos ao homem e outros mamíferos. A eliminação desses compostos e de seus metabólitos ocorre principalmente pela urina e pelas fezes (KARALLIEDDE & SENANAYAKE, 1989).

Os carbamatos são encontrados em produtos de biotransformação nos trabalhadores expostos a esses compostos, porém não provocam efeitos tóxicos alarmantes. Entre as reações metabólicas que ocorrem no seu metabolismo estão a oxidação do grupo alquil, a hidrólise da ligação carbamato e a conjugação direta com ácido glicurônico, formando N-glicuronidas, após o que o composto é eliminado pela urina (BRITO FILHO, 1985; LARINI, 1987).

Embora os mecanismos de ação dos inseticidas nos organismos não estejam ainda completamente definidos, não parece haver dúvida de que sejam neurotóxicos. A neurotoxicidade dos piretróides e dos organoclorados parece ser devida a que esses inseticidas interromperiam o fluxo de impulsos nervosos no axônio dos neurônios, reagindo com as substâncias que recobrem essas células. Isso alteraria a permeabilidade dos íons sódio (Na+) e potássio (K+) na membrana, bloqueando as trocas de íons entre o interior e o exterior das células, o que resultaria no bloqueio da transmissão dos impulsos. Tal bloqueio levaria o animal à exaustão e, para obtenção de energia, começariam a ser consumidas suas reservas metabólicas, o que causaria a morte (PEREIRA JÚNIOR, 1987).

Os organofosforados e carbamatos são conhecidos como inibidores da enzima acetilcolinesterase, provocando o acúmulo de um importante neurotransmissor, a acetilcolina, nas membranas pós-sinápticas que são, assim, incapazes de voltarem ao seu estado de

origem. A acetilcolina é sintetizada nas terminações axônicas e liberada nas sinapses durante a transmissão nervosa. Após exercer sua ação, a acetilcolina deve ser degradada para facilitar à transmissão de novo impulso e sua degradação é feita através da enzima acetilcolinesterase, dando como produtos finais a colina e o ácido acético. O acúmulo de acetilcolina leva à hiperestimulação e colapso do sistema nervoso. As funções respiratórias e cardíacas ficam prejudicadas e podem resultar em morte do animal (PEREIRA JUNIOR, 1987). Os carbamatos diferem dos organofosforados por terem uma ação de inibição da acetilcolinesterase mais rápida, devido a diferenças no padrão de metabolização (LOMBARDI **e col**, 1983).

I.2. Contaminação e intoxicação por pesticidas

A contaminação humana por pesticidas pode ocorrer de forma direta ou indireta. A primeira é consequência da exposição à qual são submetidos os trabalhadores da indústria de formulação ou os aplicadores, como agricultores e operários de desinsetização. Esses indivíduos absorvem diariamente, por inalação ou via dérmica, doses dez a cem vezes maiores que a população (JAGER, 1970; ZAMBRONE, 1986). A forma indireta resulta do contato da população com os inseticidas por acidentes, pela contaminação do ambiente por resíduos industriais ou em consequência de utilização pouco criteriosa dessas substâncias levando a seu acúmulo na cadeia alimentar.

A intoxicação é a manifestação de efeitos adversos que se revelam em estados patológicos ocasionados pela interação de um

agente químico com o organismo. As intoxicações por inseticidas podem ocorrer por exposição a curto, médio ou longo prazo. A intoxicação aguda está relacionada com exposição a altas concentrações do agente por períodos curtos de tempo. Como os sintomas aparecem rapidamente, a relação de causa e efeito pode ser estabelecida com facilidade. Uma intoxicação crônica é caracterizada por exposição a pequenas concentrações do composto tóxico por longos períodos de tempo. Nesses casos, é difícil estabelecer a relação de causa e efeito, porque os sinais das manifestações tóxicas aparecem meses ou anos após o início do contato e, em alguns casos, até mesmo após este ter cessado (LOMBARDI **et col.**, 1983). Os sinais mais evidentes no envenenamento agudo pelos inseticidas compreendem manifestações alérgicas, dores de cabeça, vômitos, tremores, convulsões, lesões do fígado e rins, seguidos de coma e morte. Nos casos crônicos, suspeita-se que os sinais de envenenamento podem incluir lesões cerebrais, cardíacas e renais, câncer do sistema linfático, polineurites, desmielinização, alterações reprodutivas e comportamentais (DILLIE & SMITH, 1964; TAYLOR, 1987; SENANAYAKE & KARALLIEDDE, 1987).

Entre os inseticidas, os organoclorados são os que tem maior persistência no ambiente. Se por um lado isso é uma característica benéfica, pois seu efeito sobre as pragas se mantém por muitos anos, por outro lado é também responsável pelos principais problemas associados ao seu uso, como a contaminação ambiental e os riscos à vida selvagem e humana, em consequência da exposição e acúmulo na cadeia alimentar (JAGER, 1970). Por esse motivo, e porque os insetos começaram a desenvolver resistência a

sua ação, esses produtos foram sendo gradativamente abandonados em vários países desenvolvidos. Em outros países, como Brasil, Egito e India, muitos organoclorados continuaram sendo empregados em larga escala até mais recentemente, tanto na agricultura, como no controle de vetores de doenças.

A contaminação ambiental com compostos organoclorados é largamente espalhada pelo mundo. Resíduos elevados desses compostos, por exemplo, foram referidos no Brasil por CELESTE & CACERES **e col.** (1987) em amostras de represas e rios da região leste do Estado de São Paulo, por SOUZA **e col.** (1988) em água de rios, minas, poços e solos do Estado do Paraná. Foi, também, detectada elevada contaminação ambiental por SARKAR & GUPTA (1988) em sedimentos da costa leste da India, por KUMAR **e col.** (1988) em amostra de rios e por NAIR & PILLAI (1989) em amostras de solo e rios da India, por FRANK & LOGAN (1988) em amostras coletadas em rios do Canadá e por JOHNSON **e col.** (1988) em amostras de água e sedimentos de rios dos Estados Unidos.

A contaminação biológica com esses compostos foi amplamente confirmada em alimentos, em animais e no homem. Em relação aos gêneros alimentícios, foi verificada em cereais, vegetais verdes, raízes, tubérculos, frutos, ovos, carnes e leite, entre outros. Somente para exemplificar, pode-se citar os achados de BHC, DDT e HCB por DE VOS **e col.** (1984) na Holanda, de DDT por WALISZEWSKI **e col.** (1985) na Polônia, de BHC e DDT por KAPHALIA **e col.** (1985), SINGH & CHAWLA (1988) e LAL **e col.** (1989) na India, e de DDT por WAN **e col.** (1989) na Austrália.

Os animais aquáticos são também reconhecidos como

portadores de elevados níveis de resíduos de organoclorados. Isso foi detectado em estudos com várias espécies de peixes em diferentes regiões geográficas, como no Egito (HILMY **e col.**, 1983; ALY & BADAWY, 1984 ; EL-DIB & BADAWY, 1985), na Alemanha (SCHULER **e col.**, 1985), nos Estados Unidos (SCHMITT **e col.**, 1985; SAIKI & SCHIMITT, 1986; ARRUDA **e col.**, 1987), na Itália (AMODIO-COCCHIERI & ARNESE, 1988), na Suécia (ANDERSSON **e col.**, 1988) e na Austrália (Mc DOUGALL **e col.**, 1989), entre outros. Os compostos cujos resíduos foram mais frequentemente encontrados nesses estudos foram BHC, clordane, DDT, dieldrin, HCB e heptacloro.

A contaminação humana por organoclorados foi evidenciada em vários países, desenvolvidos ou em desenvolvimento, pela detecção de resíduos desses compostos em amostras de sangue, principalmente em trabalhadores rurais que aplicavam inseticidas. Foram referidos, por exemplo, níveis elevados de dieldrin (LARA **e col.**, 1981), de clordano e seus metabólitos heptacloro, oxiclordano e trans-nonacloro (SAITO **e col.**, 1986; WARIISHI **e col.**, 1986; TAKAMIYA, 1987; STEHR-GREEN **e col.**, 1988; WARIISHI & NISHIYAMA, 1989) e de DDT (VIOLANTE **e col.**, 1986).

Todavia, os organoclorados concentram-se a longo prazo em materiais ricos em lipídios, como o tecido adiposo e o leite materno, os quais consistem nos melhores substratos para determinação do nível residual e avaliação da exposição crônica da população a esses compostos (CAMPS **e col.**, 1989). Em relação ao tecido adiposo, há referências da contaminação por resíduos de DDT, dieldrin e HCB nos Estados Unidos (ANSARI **e col.**, 1986; HOLT **e col.**, 1986), de clordane e DDT na Finlândia (MUSSALO-RAUHAMAA **e col.**,

1984), de BHC, DDT e HCB na Itália (FOCARDI **e col.**, 1986), de BHC e DDT na Turquia (KARAKAYA & OZALP, 1987) e de BHC, DDT e HCB na Espanha (CAMPS **e col.**,1989).

Já em relação ao leite materno, foram verificados níveis elevados de contaminação por dieldrin, DDT e BHC na Suíça (NOREN, 1983) e na Iugoslávia (KRAUTHACKER **e col.**, 1986), por BHC, clordano e DDT no Canadá (MES **e col.**, 1984) e na Finlândia (MUSSALO-RAUHAMAA & ANTERVO, 1988), por clordano e DDT no Iraque (AL-OMAR **e col.**, 1985), por aldrin, BHC e dieldrin no oeste da Austrália (STACEY **e col.**, 1985) e no Quênia (KANJA **e col.** 1986), por BHC na China (IP & PHILLIPS, 1989), por clordano no Japão (TOJO **e col.**, 1986; TAGUCHI & YAKUSHIJI, 1988; WARIISHI & NISHIYAMA, 1989) e por BHC e DDT no Brasil (SANT'ANA **e col.**, 1989).

As mulheres lactantes analisadas não tinham tido exposição ocupacional a pesticidas e, enquanto em alguns casos a aplicação dos organoclorados nas residências foi sugerida como o fator determinante dos elevados níveis encontrados, como aconteceu no oeste australino (STACEY **e col.**, 1985), na maioria dos casos os autores consideraram os alimentos como a mais provável fonte de contaminação da população aos organoclorados.

Os inseticidas piretróides e carbamatos causam efeitos tóxicos agudos após a absorção em altas concentrações, mas são facilmente degradados e excretados, não se acumulando em tecidos e órgãos por serem pouco solúveis em lipídios.

Os organofosforados são amplamente utilizados, por controlarem os insetos que afetam a produção agrícola, mas eles são rapidamente degradados e não persistem no ambiente. No entanto,

os efeitos tóxicos dos compostos desse tipo são os mais estudados, devido a estarem frequentemente associados à exposição ocupacional, às tentativas de suicídios e à ingestão de alimentos contaminados. Há casos de intoxicação populacional por organofosforados devido à exposição aos compostos paration, dissulfoton e malation, entre outros (SENANAYAKI & KARALLIEDDE, 1987; SAVAGE **e col.**, 1988) e de intoxicação por tentativa de suicídio com malation, fentin, monocrotofós, dimetoato ou metamidofós (HANNA **e col.**, 1983; SENANAYAKE & KARALLIEDDE, 1987).

I.3. Toxicidade dos pesticidas

Vários estudos foram realizados com o objetivo de avaliar os riscos genotóxicos causados pelos inseticidas, tanto em sistemas microbianos como em eucariotos, a maior parte deles envolvendo os organofosforados. Resume-se a seguir os resultados encontrados, separando-se os estudos pelos tipos de testes utilizados e, dentro desses, pela classe química dos compostos testados.

Em sistemas microbianos, não foram detectados efeitos mutagênicos em linhagens de **Salmonella typhimurium** tratadas com os organofosforados malation (IMAMURA & TALCOTT, 1985; PEDNEKAR **e col.**, 1987) ou fosalene (PEDNEKAR **e col.**, 1987), assim como com o organoclorado endosulfan ou o piretróide permetrina (PEDNELAR **e col.**, 1987). No entanto, efeitos mutagênicos foram encontrados por SHIAU **e col.** (1980) em linhagens de **B. subtilis** e **S. typhimurium** tratadas com o organofosforados ditano, hidrazida maleica, fumazona e malation, e por SHIRASU **e col.** (1976) em linhagens de **E. coli** e

S. typhimurium tratadas com diclorvós e vamidation.

Nos testes com eucariotos são muito mais frequentes e um dos organismos bastante utilizados é a mosca **Drosophila melanogaster.** As pesquisas de efeitos mutagênicos induzidos por piretróides nesses organismos evidenciaram resultados negativos na análise de recessivos letais ligados ao sexo e de não-disjunção, assim como de perdas de cromossomo sexual por indução com permetrina (WOODRUFF **e col.**, 1983) ou fenvalerato (BATISTE-ALENTORN **e col.**, 1987). Apenas um experimento detectou indução de recessivos letais ligados ao sexo em **D. melanogaster** após tratamento com cipermetrina na concentração de 20 ppm , porém sem frequências aumentadas de perdas de cromossomo sexual ou de não disjunção (BATISTE-ALENTORN **e col.**, 1986)

Em relação aos organofosforados há um número maior de pesquisas, a maioria delas com resultados negativos. KRAMERS & KNAAP (1978), por exemplo, não detectaram aumento de mutações letais recessivas ligadas ao sexo em larvas de **D. melanogaster** tratadas com baixas concentrações de diclorvos. Posteriormente, RAMEL **e col.** (1980) em um trabalho de revisão da literatura, concluíram que ainda não havia elementos para definir se hávia efeito mutagênico desse composto em **D. melanogaster**, através dos testes de letais recessivos ligados ao sexo e de perdas de cromossomos sexuais. Também não foram detectados efeitos mutagênicos pelos testes de letais recessivos ligados ao sexo, de perdas de cromossomos sexuais e de não-disjunção em **D. melanogaster** após tratamento com várias concentrações de malation (VELAZQUEZ **e col.**, 1987a), e com altas concentrações de fenitrotion (50 a 150 ppm) (VELAZQUEZ **e col.**,

1987b). O organofosforado dimetoato, porém, apresentou-se como fraco mutagênico no teste de letais recessivos ligados ao sexo em **D. melanogaster** (VELAZQUEZ **e col.**, 1986).

Há poucas informações referentes aos efeitos dos organoclorados em **Drosophila**, mas eles parecem exercer efeitos prejudiciais. O organoclorado endosulfan é um dos menos persistentes no ambiente e menos tóxico que muitos outros de sua classe, mas foi efetivo na indução de letais recessivos ligados ao sexo e de efeitos clastogênicos em células reprodutivas, com aumento significativo de descendentes X0 nas moscas tratadas com concentrações de 50, 100 e 200 ppm (VELAZQUEZ **e col.**, 1984). Também foi verificado por BRANCO (1989) uma redução significativa do número de descendentes, da produção de ovos, da viabilidade e da longevidade, além de atraso no tempo de desenvolvimento, em **D. melanogaster** tratada com o organoclorado dicofol.

Após exposição **in vivo**, os testes para avaliação dos efeitos mutagênicos pela ocorrência de micronúcleos, de dominantes letais e de aberrações cromossômicas em medula óssea em roedores, não mostraram evidências de indução de efeitos genotóxicos por compostos organofosforados, como o diclorvós (DEAN & BLAIR, 1976; MOUTSCHEN-DAHMEN **e col.**, 1981; DEGRAEVE **e col.**, 1984), o dimetoato (DEGRAEVE **e col.**, 1984), o malation (DULOUT **e col.**, 1983; DEGRAEVE & MOUTSCHEN, 1984; DEGRAEVE **e col.**, 1985), o paration metílico (DEGRAEVE **e col**, 1984, 1985) e o triclorfon (DEGRAEVE **e col.**, 1984; DEGRAEVE **e col.**, 1985; DZWONKOWSKA & HUBNER, 1986), entre outros. Porém, resultados positivos foram encontrados em células de medula óssea de roedores, pelo teste de aberrações cromossômicas

após tratamento com os fosforados ekatin, forato e paration metílico (MALHI & GROVER, 1987) e pelo teste de micronúcleos após tratamento por compostos organofosforados, como dimetoato e fosfamidon (RANI **e col.**, 1980), ekatin, forato e paration metílico (GROVER & MALHI, 1985) e tafetion (BRUNYA & BEHERA, 1989). Após exposição dérmica a dose única ou a doses múltiplas de malation, células somáticas (medula óssea) e germinativas (espermatócitos primário) de camundongos apresentaram frequências aumentadas de aberrações cromossômicas (SALVADORI **e col.**, 1988).

Em pesquisas com organoclorados, RANI **e col.** (1980) não detectaram efeitos mutagênicos em camundongos tratados com aldrin e endosulfan, avaliando as frequências de micronúcleos em células de medula óssea de roedores e pela análise da linhagem G46 de **Salmonella typhimurium** no teste do hospedeiro intermediário. Todavia resultados positivos foram obtidos pela análise de aberrações cromossômicas em medula óssea de roedores tratados com dieldrin (MAJUMDAR **e col.**, 1976) e com endosulfan e metoxicloro (DZWONKOWSKA & HUBNER, 1986), assim como pelo teste de dominante letais ligados ao sexo em roedores tratados com BHC (LAKKAD **e col.**, 1982).

Após tratamento **in vivo**, não foram encontrados efeitos mutagênicos do carbamato carbaril pela análise de micronúcleos, do teste de hospedeiro intermediário e das frequências de aberrações cromossômicas em células de medula óssea de roedores (RANI **e col.**, 1980; DZWONKOWSKA & HUBNER, 1986).

Em relação aos piretróides, CHATTERJEE **e col.** (1982) detectaram efeitos mutagênicos e cumulativos do fenvalerato em células de medula óssea de ratos, pela análise de aberrações

cromossômicas após tratamento crônico (12 semanas) com altas doses (2000 ppm).

Em culturas de células tratadas **in vitro**, DEAN (1972) constatou que o organofosforado diclorvós foi citotóxico aos linfócitos humanos por inibição de divisão celular e degeneração de cromossomos metafásicos, porém não induziu aberrações cromossômicas e, consequentemente, não foi considerado mutagênico. Não foi observado aumento nas frequências de aberrações cromossômicas em linhagens hematopoiéticas humanas tratadas com os organofosforados dissulfoton, malation e paration metílico (HUANG, 1972), e diazinon (LOPEZ **e col.**, 1986), nem em linhagens celulares V79 de hamster tratadas com diazinon e dissulfoton (CHEN **e col.**, 1981). Também não houve indução de trocas entre cromátides-irmãs em linhagens linfóides humanas tratadas com azodrin, diazinon, diclofention, dimetoato, dursban, etion, fention e forato (SOBTI **e col.**, 1982; LOPEZ **e col.**, 1986).

No entanto, frequências aumentadas de trocas entre cromátides-irmãs foram encontradas em culturas de fibroblastos de pulmão fetal humano tratadas com baixas concentrações de malation (NICHOLAS **e col.**, 1979), na linhagem celular V79 de hamster chinês tratada com demeton, dimetoato, malation. metidation, paration metílico e triclorfon (CHEN **e col.**, 1981) e em linhagens linfóides humanas tratadas com fosdrin, malation, paration metílico e paration (SOBTI **e col.**, 1982).

Os efeitos **in vitro** dos organoclorados em culturas celulares foram pouco investigados. Na literatura encontra-se o estudo de TSUSHIMOTO **e col.** (1983), que não detectaram efeito

mutagênico na linhagem celular V79 de hamster chinês tratada com BHC, clordano e DDT. Porém, frequências aumentadas de aberrações cromossômicas foram observadas por LESSA **e col.** (1976), em linfócitos submetidos a DDT, e por MAJUMDAR **e col.** (1976), em células de pulmão de embrião humano submetidas a dieldrin.

BLEVINS **e col.** (1977) mostraram, em culturas de linfócitos humanos, que os carbamatos aldicarb, carbofuran, landrin, metomil e propoxur não induziram quebras no filamento do DNA, mas seus derivados n-nitroso o fizeram. Porém, foi detectada incidência aumentada de trocas entre cromátides-irmãs (CID & MATOS, 1984) e de aberrações cromossômicas (CID & MATOS, 1987) em culturas de linfócitos humanos tratados com aldicarb.

A indução de mutagenicidade por inseticidas, portanto, ainda não foi completamente avaliada em testes citogenéticos ou não-citogenéticos, e os resultados já obtidos nem sempre mostraram concordância. Uma das dificuldades para a completa avaliação dos compostos relaciona-se com a gama de novas formulações que surgem a cada ano, associada aos elevados custos dos testes e à falta de infra-estrutura e pessoal com qualificação adequada para a sua realização. Essas condições destacam-se nos países em desenvolvimento, nos quais, paradoxalmente, os pesticidas acabam sendo utilizados em maior quantidade e em piores condições de segurança. A falta de concordância aos resultados finais pode estar associada a inúmeras causas, destacando-se entre elas os diferentes sistemas de testes empregados, os organismos ou células-alvo e as concentrações utilizadas.

I.4. Exposição ocupacional

O impacto dos pesticidas na saúde de trabalhadores envolvidos em sua formulação e uso não é, também completamente conhecido. No entanto, os efeitos genotóxicos estão entre os mais sérios dos possíveis efeitos dos produtos químicos agrícolas e merecem atenção especial, devido à natureza geralmente irreversível do processo e ao longo período de latência associado a sua manifestação.

A monitorização biológica dos trabalhadores ocupacionalmente expostos aos inseticidas é um instrumento importante para a avaliação dos riscos que esses compostos oferecem à saúde humana. Os estudos realizados em trabalhadores ocupacionalmente expostos a inseticidas devem detectar o efeito das condições de trabalho às quais esses indivíduos estão sujeitos e, dessa forma, evitam-se as incertezas envolvidas na interpretação de resultados obtidos em experimentos realizados com animais e extrapolados para o homem.

O uso de compostos químicos no combate a vetores de endemias, tanto no Brasil como em outros países, vem ocorrendo há várias décadas e tem exposto grupos de trabalhadores que atuam na aplicação desses compostos (ZAMBRONE, 1985). Nos últimos anos, a incidência de doença de Chagas, esquistossomose, febre amarela, leishmaniose, malária e dengue vêm aumentando consideravelmente nas regiões central, oeste e norte do Brasil, principalmente em decorrência do modo pelo qual está sendo feita a ocupação dessas áreas (WANDERLEY, 1985). O intenso fluxo migratório para a região

sudeste do país representa um constante risco de reintrodução dessas doenças no estado de São Paulo e, por isso, a Superintendência de Controle de Endemias da Secretaria de Saúde Pública do Estado de São Paulo (SUCEN), mantém um programa constante de vigilância epidemiológica com a finalidade de evitar novos focos da doenças e debelá-los em curto espaço de tempo, no caso de sua ocorrência. O presente projeto é parte de um estudo multidisciplinar, com o objetivo de analisar desinsetizadores da SUCEN sob os aspectos bioquímico, clínico e citogenético.

I.5. Objetivos

Esta investigação citogenética teve por objetivo principal avaliar os efeitos mutagênicos dos inseticidas em desinsetizadores da SUCEN, que são trabalhadores cronicamente expostos, através de dois parâmetros distintos: a análise das frequências de aberrações cromossômicas estruturais e numéricas e a de trocas entre cromátides-irmãs.

A fim de se alcançar este objetivo programou-se:

a) comparar as frequências desses parâmetros encontradados nos desinsetizadores com as de uma amostra de indivíduos sem contato profissional com agentes químicos, de mesmo sexo e nível sócio-econômico que os desinsetizadores,

b) correlacionar as frequências de aberrações cromossômicas com as de TCI nos indivíduos expostos e

c) associar as frequências de cada um desses parâmetros com o tempo de exposição profissional aos inseticidas e com o tipo de

composto utilizado.

A avaliação citogenética, em associação com os resultados dos demais exames, deve contribuir para a monitorização biológica desses trabalhadores, detectando o efeito das condições de trabalho às quais eles estão sujeitos e fornecendo subsídios que sugiram medidas para melhorar as condições de segurança ocupacional dos desinsetizadores da SUCEN.

II. MATERIAL E METODOS

II.1. Caracterização da amostra

O estudo cromossômico foi realizado em vinte e nove homens aplicadores de inseticidas que trabalhavam como desinsetizadores do Serviço Regional-8 (SR-8) da SUCEN. Esses indivíduos participaram total ou parcialmente das campanhas para erradicação da malária e do combate à esquistossomose, à leishmaniose e , mais recentemente, do programa para erradicação dos vetores de febre amarela e do dengue. A idade, o período de exposição em anos e a discriminação dos compostos manipulados por cada um dos indivíduos estudados são apresentados na Tabela 1.

Dezesseis aplicadores eram fumantes, sendo seis (indivíduos AF2, AF5, AF8, AF12, AF13 e AF16) fumantes leves, com consumo de 1 a 5 cigarros por dia. Os três primeiros fumavam cigarros com filtro e os outros três cigarros de palha. Dez aplicadores eram fumantes intensos, com consumo diário variável de 20 a 60 cigarros com filtro por dia. Os outros treze aplicadores não eram fumantes.

Os aplicadores fumantes (AF) tinham de 46 a 59 anos de idade, com média e desvio padrão de 51,2 $\pm$ 0,77 anos e tiveram contato profissional com inseticidas por período variável de 21 a 33 anos, com média e desvio padrão de 27,1 $\pm$ 0,75 anos. Nos aplicadores não-fumantes (ANF) a idade variou de 48 a 63 anos, com média e desvio padrão de 54,15 $\pm$ 1,33 anos; o tempo de contato profissional com inseticidas variou de 20 a 33 anos, com média e desvio padrão de

27,9 ± 0,82 anos. Cinco dos participantes da amostra de aplicadores encontram-se atualmente exercendo outras funções: AF5 é atendente de equipe de profilaxia há dois anos, AF7 é encarregado de setor de transporte há 11 anos, AF8 é vigia de depósito de veneno há 11 anos, AF11 é almoxarife há seis anos e ANF2 é auxiliar de laboratório há 11 anos. No entanto, foram mantidos na amostra por continuarem em contato com os inseticidas, praticamente no mesmo nível em que o faziam quando eram desinsetizadores.

Os compostos manipulados, cujas sinonímias encontram-se entre parenteses após os nomes comuns ou técnicos, foram os organoclorados BHC (HCH, hexaclorociclohexano), DDT (clorofenotano, dicofano, zerdano) e clordano (octacloro, toxichlor), os organofosforados cythion, diazinon (basudin, dimpylate), fenitrotion (folithion, sumithion), malation (carbofós, mercaptothion, folithion) e temefós (abate), o carbamato propoxur (aprocarb, unden, baygon) e o piretróide deltametrina (decis, K-obiol, K-otrina).

A manipulação desses compostos teve início em 1959, com a aplicação diária do composto DDT, seguido pelo BHC em 1965. A partir de 1968, BHC e DDT passaram a ser aplicados três vezes por semana e, nos anos de 1975 até 1988, a utilização desses compostos foi reduzida para uma ou duas vezes por semana, por cerca de 8 horas por dia até sua extinção completa a partir de 1989. Os demais compostos começaram a ser aplicados a partir de 1980: propoxur em 1980, clordano em 1982, temefós e diazinon em 1984 e cytion, fenitrotion e malation em 1985, com o programa de erradicação dos vetores de febre amarela e do dengue, uma vez por semana com média de 4 horas por dia. Em 1988 foi introduzida a deltametrina, em substituição aos

organoclorados, no combate aos vetores da doença de Chagas, e as aplicações eram feitas por cerca de 8 horas por dia, uma ou duas vezes por semana.

Os compostos manipulados com maior frequência foram BHC, DDT, propoxur e fenitrotion, sendo os dois primeiros manipulados por todos os integrantes da amostra. Para o preparo dos inseticidas formulados em pó, foram utilizados baldes galvanizados e pás de madeira e os de formulação líquida foram diluídos no tanque da própria bomba de pulverização. A pulverização foi feita com bombas manuais cilíndricas com capacidade de 8 litros da marca Hudson. A pulverização ambiental com organofosforados e a nebulização com a mistura de carbamatos e óleo diesel vem sendo feita a partir de 1984, em épocas específicas, ou seja, durante os meses de novembro a março. Durante a aplicação dos inseticidas não foram usados quaisquer dispositivos de proteção individual, como macacão, luvas, botas ou máscaras, com exceção de 6 aplicadores (AF3, AF4, AF14, ANF1, ANF7 e ANF13), que referiram uso de máscaras ou filtro para produtos químicos nas pulverizações ambientais com organofosforados.

Como controles foram analisados vinte funcionários de instituições públicas, 5 dos quais eram fumantes intensos de longa data (com cerca de 20 cigarros com filtro por dia) e 15 não-fumantes, pareados com os aplicadores quanto ao sexo e ao nível sócio-econômico. Eles não manifestavam doenças crônicas, não referiram o uso constante de medicamentos ou a ingestão de bebidas alcoólicas, e não faziam uso de dietas alimentares especiais. Na Tabela 2 estão apresentadas a idade dos controles fumantes, que variou de 38 a 51 anos, com média e desvio padrão de 41,8 $\pm$ 2,41, a

Tabela 1. Caracterização da amostra de aplicadores. AF= aplicadores , ANF= aplicadores não-fumantes.

Amostra	Indivíduo	Idade	Período de atuação (anos)	Compostos manipulados**
AF	1	53	28	1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9 e 10
	2	52	30	1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9 e 10
	3	46	27	1, 2, 4, 7, 8, 9 e 10
	4	49	30	1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9 e 10
	5*	55	27	1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10
	6	51	25	1, 2, 3, 6, 9 e 10
	7*	49	24	1 e 2
	8*	52	24	1, 2 e 9
	9	59	33	1, 2, 7, 8, 9 e 10
	10	49	28	1, 2 e 9
	11*	52	29	1, 2, 4, 5, 6, 7 e 10
	12	49	29	1, 2, 7 e 10
	13	50	24	1, 2, 7, 8, 9 e 10
	14	50	21	1, 2, 7, 8, 9 e 10
	15	54	26	1, 2, 7, 8, 9 e 10
	16	49	28	1, 2, 8, 9 e 10
ANF	1	48	28	1, 2, 3, 5, 6, 7, 8 e 9
	2*	51	20	1, 2 e 10
	3	53	28	1, 2, 5, 7 e 9
	4	54	27	1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9 e 10
	5	61	26	1, 2, 4, 6, 7, 8, 9 e 10
	6	52	28	1, 2, 3, 4, 7, 8, 9 e 10
	7	50	28	1, 2, 7, 8, 9 e 10
	8	60	30	1, 2, 7, 8, 9 e 10
	9	63	30	1, 2, 7 e 10
	10	54	29	1, 2, 3, 4, 6, 9 e 10
	11	48	27	1, 2 e 9
	12	54	29	1, 2, 3, 6, 7, 8, 9 e 10
	13	56	33	1, 2, 8, 9 e 10

* não estão atualmente aplicando inseticidas, devido a mudança de função dentro da SUCEN, mas continuam manipulando-os profissionalmente.

**1: BHC; 2: DDT; 3: clordane; 4: cythion; 5: deltametrina; 6: diazinon; 7: fenitrotion; 8: malation; 9: propoxur; 10: temefós.

Tabela 2. Caracterização da amostra controle. CF: fumantes; CNF: não-fumantes.

Amostra	Indivíduo	Idade	Tempo de Serviço(anos)	Profissão
CF	1	38	18	Auxiliar de planejamento
	2	38	14	Agente de saneamento
	3	51	11	Garagista
	4	40	15	Motorista
	5	42	13	Pedreiro
CNF	1	63	23	Agente de saneamento
	2	53	19	Motorista
	3	61	29	Escriturário
	4	52	18	Auxiliar de laboratório
	5	54	30	Atendente
	6	54	25	Motorista
	7	64	35	Servente
	8	55	24	Motorista
	9	49	18	Técnico de aparelhos de precisão
	10	43	6	Servente de pedreiro
	11	37	6	Almoxarife
	12	41	18	Atendente
	13	47	5	Oficial de manutenção
	14	40	16	Agente de saneamento
	15	59	25	Oficial de manutenção

profissão e o tempo de serviço de cada um. Nos controles não-fumantes a idade variou de 40 a 63 anos, com média e desvio padrão de 51,5 ± 2,20 anos. Os constituintes desta amostra não estiveram expostos profissionalmente a pesticidas, mas alguns referiram o uso esporádico de inseticidas de uso doméstico com fórmulas à base de piretróides e organofosforados.

II.2. Análise citogenética

Foram coletados 10 ml de sangue de cada indivíduo e as culturas de linfócitos foram desenvolvidas no Laboratório de Citogenética Humana e de Vertebrados do Departamento de Biologia do IBILCE de São José do Rio Preto, UNESP. Os linfócitos foram cultivados segundo a técnica de MOORHEAD **e col.** (1960), com modificações. Foi utilizado meio de cultura RPMI 1640 (Cultilab), enriquecido com 20% de soro AB humano, penicilina e estreptomicina. Em um frasco de cultura foram colocados 14 ml de meio completo, 1,5 ml de plasma sanguíneo rico em linfócitos e fito-hemaglutinina (fornecida pelo Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Riberão Preto), na concentração final de 0,36 mg/ml de meio. Posteriormente este material foi dividido em três réplicas e mantido em estufa à $37^{0}C$, por 71 horas. Uma hora antes da colheita, foi adicionado a cada frasco 0,1 ml de colquicina Houdé a $4.10^{-5}M$, para interrupção da divisão celular. Em seguida, procedeu-se à hipotonização com KCl a 0,075 M e à fixação do material com metanol-ácido acético na proporção de 3:1. A suspensão celular foi gotejada em lâminas úmidas e geladas que, posteriormente, sofreram hidrólise

com HCl 1 N a 60°C, por 7 minutos, e foram coradas por 5 minutos em solução tamponada de Giemsa a 2%.

Para marcação diferencial das cromátides-irmãs, que possibilita a avaliação da frequência de trocas entre cromátides-irmãs, foi utilizada a técnica proposta por KORENBERG & FREEDLENDER (1974), com algumas modificações. Para tanto, duas das três réplicas receberam 5-bromodesoxiuridina (5-BrdU, Sigma) na concentração final de $3,25 \times 10^{-5}$M, no início das culturas. Esses frascos foram previamente cobertos com papel alumínio para impedir a fotólise das cadeias de DNA que incorporam a BrdU. Após o preparo dos estendidos, as lâminas foram lavadas, secas ao ar e envelhecidas em estufa à temperatura de 90 à 95°C, por vinte minutos. Em seguida, o material foi submetido a tratamento com Hoechst 33258 (Sigma) em solução fisiológica de Hanks a 0,5% com concentração final de 5 µg/ml e exposto à luz ultra-violeta por 12 minutos, a uma distância de 20 cm. As lâminas foram, posteriormente, lavadas em água destilada, secas ao ar e incubadas em tampão fosfato NaH_2PO_4 1 M, pH 8,1-8,3 à 87-89° C, por um período variável de 8 a 30 segundos. Após nova lavagem rápida em água destilada, foram coradas com solução de Giemsa a 2%, por 5 minutos. As lâminas foram, então, codificadas e a análise citogenética realizada em teste cego.

A investigação do cariótipo foi feita em cem metáfases de cada indivíduo e a classificação das anomalias encontradas obedeceu as normas da Conferência de Paris (1971) e da ISCN (1978). Foram consideradas como quebras cromossômicas as descontinuidades com desalinhamento nítido no mesmo loco de ambas as cromátides de um cromossomo, como quebras cromatídicas as descontinuidades que

afetavam uma única cromátide, e como quebras centroméricas as que afetavam o centrômero. Foram consideradas como falhas cromossômicas as descontinuidades com desalinhamento mínimo no loco em ambas as cromátides e como falhas cromatídicas quando apenas uma das cromátides era afetada. Designou-se cromossomo marcador aquele que não se classificava em um dos grupos cromossômicos normais e identificou-se uma deficiência quando um dos braços cromossômicos era nitidamente menor que o esperado. Os segmentos cromossômicos que não manifestavam a presença do centrômero foram considerados fragmentos acêntricos. Quando as anomalias eram quebras ou falhas anotaram-se os cromossomos ou grupos cromossômicos envolvidos, a região cromossômica afetada (terço proximal, mediano ou distal) e o tipo de evento encontrado. Nas metáfases hipodiplóides ou hiperdiplóides foram identificados os grupos cromossômicos com elementos ausentes ou em excesso.

A frequência de trocas entre cromátides-irmãs em cada amostra foi analisada em 50 metáfases com 46 cromossomos de segundo ciclo celular, ou seja, naquelas cujos cromossomos apresentavam uma cromátide mais fortemente e outra mais fracamente corada, ou então que apresentavam segmentos muito e pouco corados intercalados. Foi identificada a localização da troca no terço proximal, mediano ou distal e, quando possível, o braço cromossômico portador.

A análise cromossômica foi realizada em microscópio óptico marca Carl Zeiss Jena, modelos Laboval 3 e Jenamed 2, utilizando-se óleo de imersão DIN 58884 (Carl Zeiss Oberkochen) para análise das trocas entre cromátides-irmãs e óleo mineral Nujol para análise de aberrações cromossômicas sob objetiva de imersão. De cada indivíduo

foram fotografadas as metáfases com as frequências máxima e mínima de trocas entre cromátides-irmãs por célula, e os diversos tipos de anomalias estruturais e numéricas observadas. O material foi fotografado em microscópio Carl Zeiss modelo Standard WL com equipamento fotográfico MC 63A (Carl Zeiss Oberkochen) com filme Panatomic X 32 ASA ou Kodalith Orthofilm 6556 type 3 (Kodak). Para revelação do negativo foi usado revelador Kodak D-72, em diluição 1:1, por dois minutos e meio à 20^{0}C, e as cópias foram feitas em papel Kodabromide F3 ou F4 e Kodabrome F2 ou F3.

II.3. Análise estatística

As frequências de anomalias cromossômicas e de trocas entre cromátides-irmãs das subamostras de aplicadores fumantes (AF), aplicadores não-fumantes (ANF), controles fumantes (CF) e controles não-fumantes (CNF) sofreram a transformação arcoseno da raiz da proporção com a finalidade de estabilizar as variâncias dos grupos estudados.

As comparações das frequências de anomalias cromossômicas e de trocas entre cromátides-irmãs entre as subamostras foram feitas por análise de variância (ANOVA). Utilizou-se o qui-quadrado para testar a igualdade das distribuições de células que apresentavam anomalias nas amostras de aplicadores e controles e a casualidade nas distribuições de anomalias e de trocas entre cromátides-irmãs ao longo dos cromossomos, com base no tamanho dos cromossomos proposto por LUBS **e col.** (ISCN, 1978), assim como a casualidade na distribuição de eventos como quebras e falhas e de trocas entre

cromátides-irmãs nas regiões proximal, mediana e distal dos cromossomos. Para comparação das frequências de metáfases normais e anômalas entre as amostras A e C utilizou-se o teste Z e para a comparação das frequências médias de células com aberrações cromossômicas e de TCI/célula entre os grupos expostos aos diferentes tipos de inseticidas utilizou-se o test t de Student.

O coeficiente de correlação foi usado para testar as relações de dependência entre as frequências de anomalias cromossômicas ou de trocas entre cromátides-irmãs com o tempo de exposição profissional aos inseticidas e o consumo diário de cigarros, assim como para a análise das relações de dependência entre as frequências de anomalias cromossômicas e de trocas entre cromátides-irmãs.

Os testes estatísticos seguiram fórmulas apresentadas por NETER & WASSERMAN (1977) e o nível crítico da rejeição da hipótese de nulidade foi fixada em 5%.

III. RESULTADOS

III.1. Aberrações cromossômicas

As frequências de anomalias cromossômicas encontradas nas 100 células analisadas de cada indivíduo das amostras de aplicadores e controles são mostradas na Tabela 3, sendo os eventos estruturais (93% dos eventos anômalos encontrados nos aplicadores e 87% dos encontrados nos controles) muito mais comuns que os numéricos (7% dos encontrados nos aplicadores e 13% dos encontrados nos controles). Na Tabela 4 são apresentadas as frequências de cada tipo de evento nas subamostras, agrupados os indivíduos como fumantes e não-fumantes, e nas amostras de aplicadores e controles. Os aplicadores apresentam anomalias cromossômicas em 3,45% das células e os controles em 2,70% das células. Em todos os casos, os eventos cromossômicos anômalos mais frequentes foram falhas e quebras, encontrados em 2,24% das células dos aplicadores e em 2,10% das células dos controles, e as anomalias numéricas (hipodiploidia e hiperdiploidia) apareceram em baixas frequências, ou seja, em 0,28% das células dos aplicadores e em 0,35% dos controles. As outras anomalias estruturais, que incluem fragmentos , cromossomos com deficiências e rearranjos, assim como cromossomos marcadores, foram encontradas em 1,0% das células dos aplicadores e em 0,25% das células dos controles.

Nas quatro subamostras, a maioria das metáfases com anomalias apresentou um único evento por célula: na subamostra de aplicadores fumantes (AF) apenas duas metáfases apresentaram dois

eventos anômalos, na subamostra de aplicadores não-fumantes (ANF) apenas três células tinham dois eventos, nos controles fumantes (CF) os eventos ocorreram em células diferentes e na subamostra de controles não-fumantes apareceram duas células com dois eventos anômalos.

As frequências relativas de quebras e falhas cromossômicas e cromatídicas, de outras anomalias estruturais e de anomalias numéricas nas amostras de A e C são representadas graficamente na Figura 1. Na Tabela 5 apresenta-se o resultado da análise de variância para comparação das frequências de metáfases com anomalias cromossômicas estruturais entre as quatro subamostras (AF, ANF, CF e CNF), após transformação para arcoseno da raiz da proporção, concluindo-se pela não rejeição da igualdade das médias entre as quatro subamostras.

Todavia, enquanto os aplicadores apresentavam 68% das anomalias estruturais representadas por quebras ou falhas e 32% representados por outras anomalias, 89% das anomalias estruturais dos controles eram quebras ou falhas e somente 11% eram de outros tipos. Comparando-se as amostras em relação à incidência e distribuição dos diferentes tipos de anomalias, verificam-se os resultados apresentados na Tabela 6. Aplicadores e controles não diferem quanto às frequências totais de metáfases com anomalias estruturais ($Z= 1,83$; g.l.$= 1$; $P > 0,05$) ou quanto às frequências de metáfases com quebras e falhas ($Z= 0,24$; g.l.$= 1$; $P > 0,05$). Por outro lado, foi detectada diferença significativa entre aplicadores e controles em relação às frequências de metáfases com outros tipos de anomalias estruturais ($Z= 3,75$; g.l.$= 1$; $P < 0,05$).

As anomalias cromossômicas estruturais classificadas como "outras", assim como os cromossomos ausentes ou presentes em excesso nos casos de aneuploidia, estão discriminados na Tabela 7. Os cromossomos marcadores extras, que foram assim designados quando não se enquadraram pela forma e tamanho em um dos grupos cromossômicos, foram incluídos como anomalias estruturais.

Na subamostra AF, foram identificadas como possíveis translocações recíprocas as anomalias detectadas nos indivíduos AF2 (Figura 2a), AF9 e AF14, e como deficiências os achados nos indivíduos AF3, AF4 (Figura 3a), AF12 (Figura 3b), AF13 (Figura 3c) e AF14 (Figura 3d). Em outras metáfases, a seguir discriminadas, foram detectados cromossomos marcadores ou rearranjos que não puderam ser identificados ao nível de resolução da técnica utilizada. Em AF3, foi também encontrada uma metáfase com ausência de um cromossomo do grupo B, com um cromossomo marcador metacêntrico grande semelhante ao A1 e um fragmento acêntrico do tamanho de um cromossomo D (Figura 5a). Em AF6, uma metáfase apresentou um cromossomo metacêntrico a mais, identificado como marcador por ser pouco maior que o cromossomo E16 e menor que os cromossomos do grupo C. Em AF8, encontrou-se uma metáfase com um cromossomo do grupo D com o braço longo bastante aumentado em relação aos demais do grupo, com um C a mais e um cromossomo G a menos. Em AF16 foi encontrada uma metáfase na qual faltavam cromossomos dos grupos B e F, e havia dois cromossomos marcadores extras, sendo ambos acrocêntricos, um deles com tamanho maior que um D (Dq+) e outro com tamanho menor (Dq-) (Figura 5b). Em quatro casos foram encontrados fragmentos acêntricos: um maior que um cromossomo G, que também poderia ser

interpretado como um cromossomo em anel em AF5, um aproximadamente do tamanho de um cromossomo G em AF11 (Figura 6a), um com tamanho intermediário entre os grupos D e E em AF13 (Figura 6b) e um do tamanho de um cromossomo pequeno do grupo C em AF16 (Figura 6c). Três células eram hipodiplóides, estando ausentes um cromossomo do grupo G (AF1), um do grupo D (AF3) e um do grupo C (AF8); duas células eram hiperdiplóides (AF5 e AF10), estando presente um cromossomo extra do grupo C em cada.

Na subamostra ANF, foram interpretados como translocações recíprocas os achados em uma célula de ANF6 (Figura 2b) e em duas de ANF7 (Figura 2c), uma das quais também tinha um fragmento acêntrico do tamanho de um cromossomo D. Foram encontradas deficiências cromossômicas em células de ANF3, ANF4, ANF7 (Figura 4b), ANF10 e ANF11, e em ANF10 foi encontrada uma célula com um dos cromossomos D apresentando o braço curto bastante aumentado (Dp+). Cromossomos marcadores extras foram detectados em várias células: um cromossomo submetacêntrico com tamanho entre os cromossomos G e F em uma célula do ANF4 e um marcador submetacêntrico do tamanho de um G em ANF10. ANF7 apresentou duas células com anomalias: em uma dela havia um marcador submetacêntrico grande, interpretado como sendo um cromossomo 1 com um dos braços aumentado, ausência de um cromossomo D, um fragmento acêntrico do tamanho de um cromossomo E16 e um marcador submetacêntrico do tamanho de um cromossomo G (Figura 7a); na outra célula não se localizou um E16, mas havia um C extra, que poderia representar um E16 com segmento cromossômico adicional em um de seus braços. As anomalias numéricas encontradas nessa subamostra foram uma célula hipodiplóide, com ausência de um

cromossomo E18, em ANF3, e uma célula hiperdiplóide com um cromossomo Y extra, em ANF6. Além disso, em ANF13, foi encontrada uma célula com quarenta e oito cromossomos, com ausência de um F e presença de três cromossomos extras que foram identificados como A1, B e D (Figura 7b).

Das quatro anomalias estruturais classificadas como "outras", no grupo CF, duas foram encontradas em células do indivíduo CF1: uma constituída por provável inversão pericêntrica do A1 (Figura 7c) e outra por deficiência do braço longo de um cromossomo D. Em CF2, foi encontrado um cromossomo marcador submetacêntrico pouco maior que um cromossomo do grupo G, interpretado como Cq- (Figura 4c) e o fragmento acêntrico encontrado em uma célula de CF5 tinha tamanho intermediário entre os cromossomos do grupo E e F (Figura 6d). Nessa subamostra não foram observadas metáfases com anomalias numéricas.

Na subamostra CNF foi observada uma célula com provável translocação, no indivíduo CNF13, e sete metáfases com anomalias numéricas, das quais quatro eram hipodiplóides, estando ausentes um cromossomo G (em CNF3 e CNF5), um cromossomo C (em CNF8) ou um cromossomo A2 (em CNF12), e três eram hiperdiplóides, estando presente um cromossomo C (em CNF12) ou um cromossomo G extra (em CNF3 e CNF8).

A Tabela 8 apresenta as frequências absolutas e relativas de quebras e falhas nas subamostras AF, ANF, CF e CNF e nas amostras A e C. Esses dados foram utilizados para a aplicação do teste Z, cujos resultados constam da Tabela 9. Nestas tabelas não foram consideradas as frequências de eventos centroméricos. As

comparações das distribuições dos diferentes tipos de eventos (quebras e falhas) em cada grupo não detectaram diferenças significativas, exceto na amostra A, na qual a frequência de quebras é significativamente maior que a de falhas ($Z = 1,97$; $P < 0,05$), principalmente devido à diferença encontrada na subamostra AF ($Z = 2,00$; $P < 0,05$). No entanto, nas comparações das distribuições de frequências dos eventos de natureza cromossômica e cromatídica não foi detectada diferença significativa em quaisquer dos grupos. As frequências de quebras e falhas quando comparadas à ocorrência no cromossomo ou na cromátide, distribuíram-se independentemente na amostra A (qui-quadrado= 4,41; g.l.= 3; $P > 0,05$) e na amostra C (qui-quadrado= 3,40; g.l.= 3; $P > 0,05$).

Na Tabela 10 estão apresentadas as frequências absolutas e relativas de quebras e falhas distribuídas pelos cromossomos ou grupos cromossômicos, nas subamostras A e C a Figura 8 ilustra graficamente as distribuições das quebras e falhas que constam dessa tabela. Na amostra A, as quebras e falhas apresentaram-se com maior frequência nos cromossomos 2, B e D, e em menor frequência ou ausentes nos cromossomos menores (grupos E, F, G+Y). E na amostra C, os cromossomos 1 e do grupo C+X, apresentaram frequências altas de quebras e falhas e frequência baixa ou ausente nos cromossomos dos grupos E, F e G+Y, quando ambas as amostras foram comparadas à distribuição de frequências esperada com base no tamanho relativo do cromossomo ou grupo cromossômico calculado por LUBS **e col.** (ISCN, 1978). Face ao pequeno número de eventos em cada classe não se analisou estatisticamente tais frequências.

As distribuições de quebras e falhas (excluídos os eventos

centroméricos) pelas regiões proximal, mediana e distal dos cromossomos ou grupos cromossômicos, das amostras A e C, encontram-se na Tabela 11, sendo que quebras e falhas ocorreram com maior frequência nas regiões proximal e mediana das amostras A e C e em menor frequência na região distal. Também não foi realizada verificação estatística da casualidade na distribuição das observações cromossômicas pelos cromossomos devido ao pequeno número de eventos. As frequências de quebras e falhas nas regiões proximal, mediano e distal (24:27:12) não se distribuem casualmente nos aplicadores (qui-quadrado= 6,00; g.l.= 2; P< 0,05), sendo observada incidência aumentada desses eventos nas regiões proximal e mediana e diminuida na região distal. Nos controles não houve diferença significativa (qui-quadrado= 2,0; g.l.= 2; P> 0,05) na distribuição de quebras e falhas nas diferentes regiões (16:17:10).

A frequência de células com aberrações cromossômicas não se correlaciona com a quantidade de cigarros fumados diariamente pelos fumantes aplicadores e controles (r= 0,064), assim também como não se correlaciona com o período em anos aos quais os aplicadores estiveram expostos profissionalmente aos inseticidas (r= 0,0018).

Na tentativa de dectar efeitos diferenciais de algumas das classes de inseticidas utilizados pelos aplicadores sobre a frequência de células com aberrações cromossômicas a amostra de aplicadores foi dividida em vários grupos, que foram comparados dois a dois. As frequências de células anômalas não diferiram entre os indivíduos expostos somente a compostos de até duas classes de inseticidas (AF7, AF8, AF10, AF11, AF12, ANF2, ANF9) e os demais (t= 0,63; P> 0,05); os com exposição a piretróides (AF1, AF2, AF4, AF5,

AF11, ANF1, ANF3, ANF4) não diferiram dos que não tiveram contacto com tais agentes (t= 0,08; P) 0,05); os não-expostos a organofosforados (AF7, AF8, AF10, AF11) não diferiram dos expostos a tal classe (t= 0,41; P) 0,05) e os não-expostos aos carbamatos (AF7, AF12, ANF2, ANF9, ANF11) também não diferiram das demais amostras (t= 1,13; P) 0,05).

III.2. Trocas entre cromátides-irmãs

Na Tabela 12 estão apresentados os números totais de trocas entre cromátides-irmãs (TCI) encontradas nas 50 células analisadas por indivíduo, assim como as médias , os desvios, os valores limites das frequências mínima e máxima, e a amplitude (máximo-mínimo) de TCI por célula para cada indivíduo das subamostras AF, ANF, CF e CNF.

Na subamostra AF, o número médio de TCI por célula variou de 8,14 a 23,50, com frequência média de 14,13, o número mínimo de TCI por célula foi 2 e o máximo 44. Em ANF, o número médio de TCI por célula variou de 8,40 à 21,50, com frequência média de 13,10, o número mínimo foi 2 e o máximo 32 TCI por célula. Em CF, o número médio de TCI por célula variou de 8,88 a 23,18, com frequência média de 16,15, o número mínimo foi 3 e o máximo 33. Em CNF, o número médio de TCI por célula variou de 7,38 à 19,12, com frequência média de 13,10, a número mínimo foi 1 e o máximo de 33. A amostra A (AF + ANF) e a amostra C (CF + CNF) apresentaram frequências médias de TCI por célula de 13,68 e 13,87, respectivamente.

A Figura 9 mostra três metáfases com coloração diferencial

entre as cromátides, uma delas tendo frequência de TCI baixa (3), uma tendo frequência intermediária (23) e outra tendo frequência alta (39). A análise de variância nas subamostras AF, ANF, CF e CNF (Tabela 13) não detectou diferenças significativas entre esses grupos. A partir desse resultado, os fumantes e não-fumantes de cada amostra foram agrupados, para diminuir a variabilidade dentro das amostras.

Os resultados agrupados das amostras A e C, em relação à distribuição de frequência de TCI por cromossomo ou grupo cromossômico, e os valores de qui-quadrado para as comparações das frequências esperadas com base no tamanho relativo dos cromossomos de acordo com LUBS **e col.** (ISCN, 1978) constam da Tabela 14. Em ambas as amostras, as distribuições das frequências de TCI não foram proporcionais ao tamanho dos cromossomos, sendo que as frequências observadas foram maiores que as esperadas nos cromossomos grandes, ou seja, no cromossomo 2 e nos grupos cromossômicos B e C+X na amostra A e nos cromossomos 1, 2 e nos grupos B e C+X da amostra C foram obtidos valores acima dos esperados, e nos cromossomos menores, o dos grupos E, F e G+Y, os valores observados foram menores que os esperados. Essas distribuições são graficamente representadas na Figura 10. A distribuição das frequências de TCI por cromossomo ou grupo cromossômico não difere entre as amostras A e C (qui-quadrado= 16,66; g.l.= 9; P) 0,05).

As distribuições das frequências de TCI por região do terço proximal (P), mediano (M) ou distal (D) dos braços cromossômicos, nas amostras A e C, encontram-se na Tabela 15. Em cada amostra as frequências de TCI observadas em cada uma dessas

regiões foram comparadas com as esperadas casualmente, tendo sido detectadas diferenças significativas tanto na amostra A (qui-quadrado= 631,07; g.l.= 2; P < 0,05) entre as regiões proximal, mediana e distal (6393:8123:5301), como na amostra C (qui-quadrado= 696,41; g.l.= 2; P < 0,05) pelas três regiões (4207:6048:3615). Em ambas as amostras as frequências de TCI são menores que o esperado na região distal e maiores que o esperado na região mediana.

Não foi encontrada correlação significativa entre as frequências de anomalias cromossômicas e as de TCI, nos aplicadores (r= 0,46) e nos controles (r= 0,012). Igualmente, não foi encontrada correlação entre as frequências de TCI por célula e o período de exposição (em anos) dos aplicadores aos inseticidas (r= -0,0015) ou o consumo diário de cigarros (r= 0,026).

As frequências médias de TCI por célula não diferiram entre os indivíduos expostos e os não-expostos a piretróides (t= 0,20; P> 0,05) e entre os expostos e não-expostos a carbamatos (t= 0,44; P> 0,05). Os expostos a inseticidas de duas classes e os demais (t= 2,24; P< 0,05) e os não-expostos a fosforados diferiram dos expostos também a esse composto (t= 3,32; P< 0,05), porém a amostra de expostos a duas classes de inseticidas e a amostra de não-expostos a fosforados são constituídos por sete e quatro indivíduos, respectivamente, de forma que tais resultados devem ser considerados com restrições.

Tabela 3. Frequência de eventos anômalos em 100 metáfases de cada indivíduo das amostras de aplicadores (A) e controles (C), discriminados por fumantes (F) e não-fumantes (NF). CS: cromossômicas, CT: cromatídica, CE: centromérica, Q: quebras, F: falhas.

Subamostra	Indivíduo	Eventos estruturais								Eventos numéricos		Total
		Quebras			Falhas		Q+F	Outros	Total	hipodiploidia	hiperdiploidia	
		CS	CT	CE	CS	CT						
AF	1		2			1	3		3	1		4
	2						0	1	1			1
	3	1	1			1	3	2	5	1		6
	4	1	2			2	5	1	6			6
	5		1				2	1	3		1	4
	6	1					1	1	2			2
	7	2		1	1	2	6		6			6
	8	1	1			1	3	1	4	1		5
	9						0	1	1			1
	10		2				2		2		1	3
	11	1				1	2	1	3			3
	12	1				1	2	1	3			3
	13	1					1	2	3			3
	14					1	1	2	3			3
	15	1					1		1			1
	16	4		1			5	2	7			7
	Total	14	9	2	1	11	37	16	53	3	2	58
ANF	1		2				2		2			2
	2						0		0			0
	3	1	3				4	1	5	1		6
	4		1	1	1		3	2	5			5
	5				1	1	2		2			2
	6		1		1	2	4	1	5		1	6
	7	2				2	4	5	9			9
	8	1			1	2	4		4			4
	9			1			1		1			1
	10	1	2		1		4	3	7			7
	11			1			1	1	2			2
	12	1					1		1			1
	13	1					1		1		1	2
	Total	7	9	3	5	7	31	13	44	1	2	47
CF	1		1				1	2	3			3
	2	2					2	1	3			3
	3	2				1	3		3			3
	4	1		1	1	1	4		4			4
	5	1			2	1	4	1	5			5
	Total	6	1	1	3	3	14	4	18			18
CNF	1	2					2		2			2
	2					1	1		1			1
	3		1				1		1	1	1	3
	4	2	2				4		4			4
	5						0		0	1		1
	6	1				1	2		2			2
	7						0		0			0
	8					2	2		2	1	1	4
	9	1	1		3	2	7		7			7
	10		1			1	2		2			2
	11	2	2			1	5		5			5
	12		1				1		1	1	1	3
	13					1	1	1	2			2
	14					1	1		1			1
	15	1					1		1			1
	Total	9	8		3	10	30	1	31	4	3	38

Tabela 4. Frequência de metáfases com anômalias estruturais e numéricas nas amostras de aplicadores (A) e controles (C).

Amostra	Número de metáfases	Met com anom. estruturais						Met. com anomalias numéricas		Total de met. com anomalias	
		Q + F		Outras		Total					
		No	%	No	%	No	%	No	%	No	%
AF	1600	36	2,25	16	1.00	51	3,19	5	0,31	56	3,50
ANF	1300	29	2,23	13	1,00	41	3,15	3	0,23	44	3,38
CF	500	14	2,28	4	0,80	18	3,60	0	0,00	18	3,60
CNF	1500	28	1,87	1	0,07	29	1,93	7	0,47	36	2,40
A	2900	65	2,24	29	1,00	92	3,17	8	0,28	100	3,45
C	2000	42	2,10	05	0,25	47	2,35	7	0,35	54	2,70

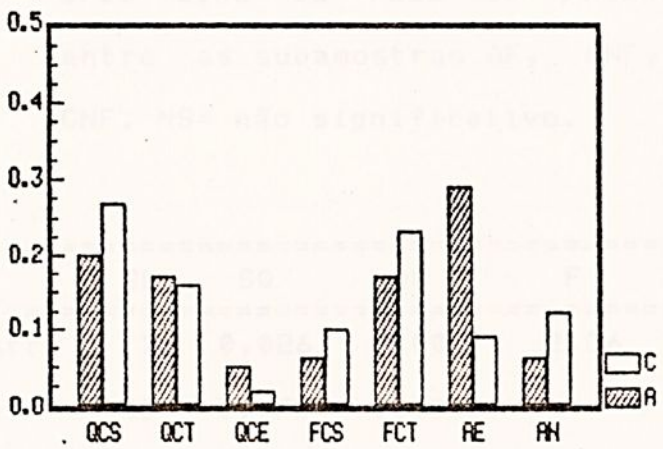


Figura 1. Frequências relativas de aberrações cromossômicas nas amostras de aplicadores (A) e controles (C). QCS: quebra cromossômica, QCT: quebra cromatídica, QCE: quebra centromérica, FCS: falha cromossômica, FCT: falha cromatídica, AE: outras anomalias estruturais, AN: anomalias numéricas.

Tabela 5. Análise de variância para comparação das frequências médias de anomalias cromossômicas, transformadas para arco seno da raiz da proporção, entre as subamostras AF, ANF, CF, CNF. NS= não significativo.

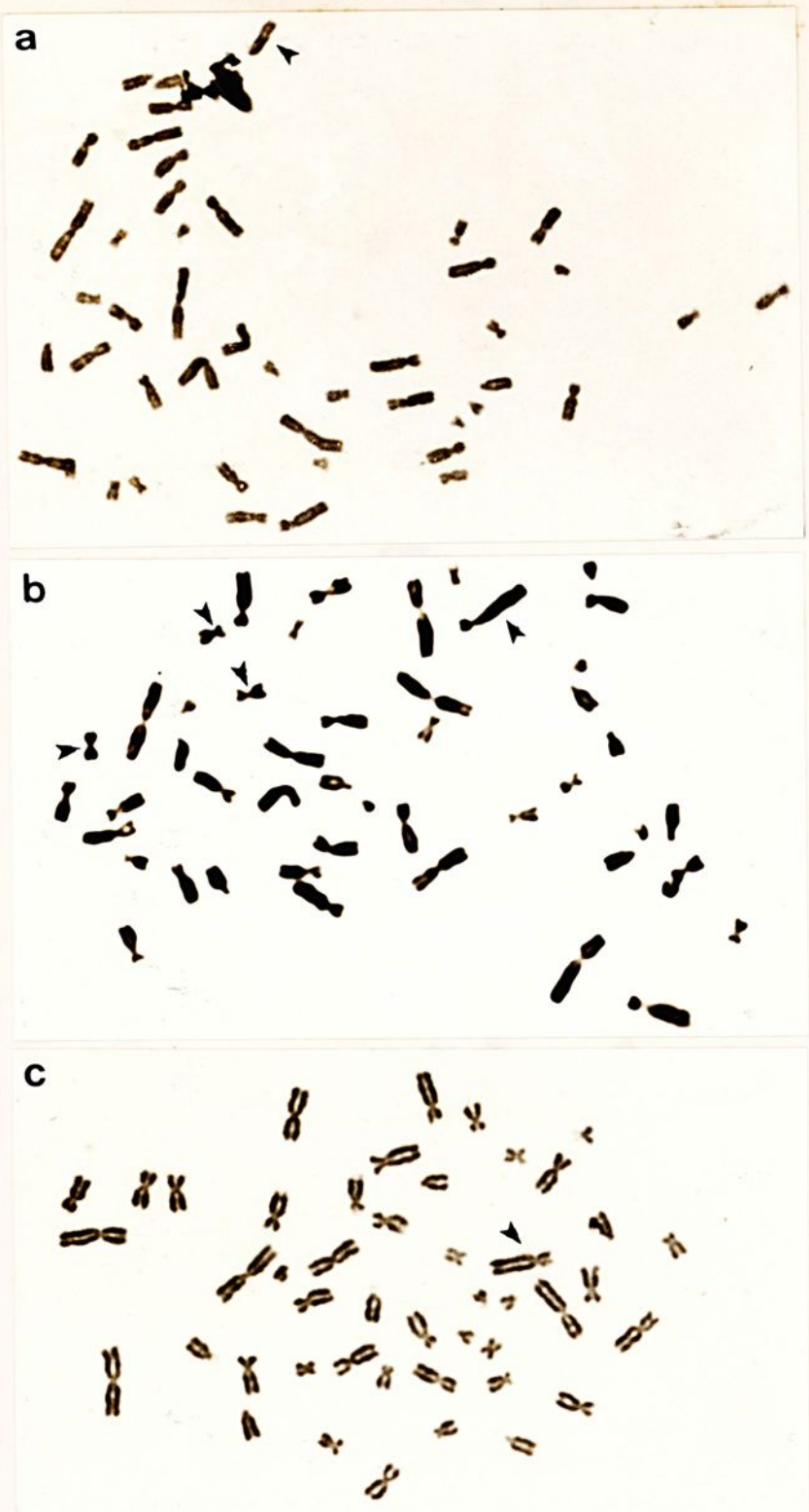
FV	GL	SQ	QM	F	
Subamostra	3	0,026	0,0087	2,26	NS
Resíduo	45	0,173	0,0038		
Total	48	0,199			

Tabela 6. Comparações, pela análise estística Z das frequências de metáfases com quebras e falhas, com outros tipos de anomalias estruturais e de frequências totais de metáfases com anomalias estruturais entre as amostras de aplicadores (A) e controles (C). FA: frequência absoluta; FR: frequência relativa; NS: não significativo; *: P< 0,05.

Frequência de metáfases		Amostra A	Amostra C	Estatística Z
Total analisado		2900	2000	
Com quebras	FA	65	42	0,24
e falhas	FR	0,022	0,021	NS
Com outras ano-	FA	29	5	3,75
malias estruturais	FR	0,01	0,002	*
Com anomalias	FA	92	47	1,83
estruturais	FR	0,032	0,023	NS

Tabela 7. Anomalias estruturais (excluídas quebras e falhas) e numéricas observadas na amostra de aplicadores fumantes (AF), aplicadores não-fumantes (ANF), controles fumantes (CF) e controles não-fumantes.

Subamostra	Indivíduo	Anomalias estruturais		Anomalias numéricas	
		Observado	Interpretado	Hipod.	Hiperd.
AF	1			-G	
	2	-D, +G, Dq+	t(D;D)		
	3	-B, +C	Bq-	-D	
		-B, +mar, +ace			
	4	-C, +E16	Cq-		
	5	+ace			+C
	6	+mar			
	8	-G, +C, Dq+		-C	
	9	-1, -G, +C, +C	t(1;G)		
	10				+C
	11	+ace			
	12	-C, +G	Cq-		
	13	+ace			
		Cp-			
	14	-C, +mar	Cq-		
		-C, +A3	t(C;C)		
	16	+ace			
		-B, -F, +mar, +mar			
ANF	3	-G, +mar	Gq-	-E18	
	4	Dq-			
		+mar			
	6	-C, +E16, Bq+	t(B;C)		+Y
	7	+ace, 2q+, Cq-	t(2;C)		
		-C, +mar	Cq-		
		-1, -D, +mar, +mar, +ace			
		-B, +C, Bq+	t(B;B)		
		-E16, +C	E16q+ ou E16p+		
	10	-C, +G	Cq-		
		-D, +C	Dp+		
		+mar			
	11	-B, +C	Bq-		
	13				-F, +1, +B, +D
CF	1	-1, +Bq+	inv 1		
		-D, +Gq-	Dq-		
	2	-C, +mar	Cq-		
	5	+ace			
CNF	3			-G	+G
	5			-G	
	8			-C	+G
	12			-A2	+C
	13	-C, -D, +A3, +G	t(C;D)		



46,XY, -D, +G, Dq+
ou t(D;D)
(AF2)

46,XY, -C, +16, Bq+
ou t(B;C)
(ANF6)

46,XY, -B, +C, Bq+
ou t(B;B)
(ANF7)

Figura 2. Metáfases com rearranjos interpretados como translocações recíprocas.



46,XY, -C, +E16
ou Cq-
(AF4)

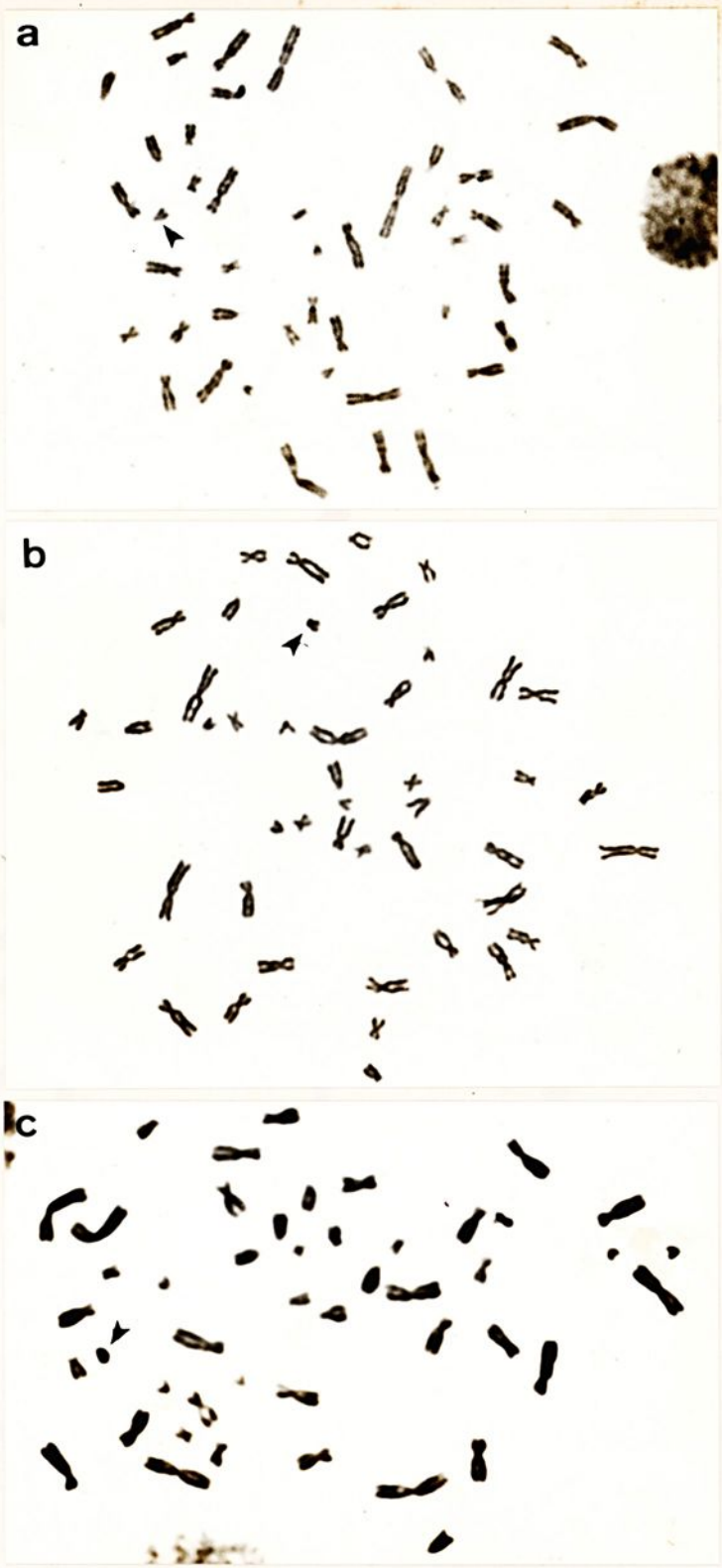


46,XY, -C, +G
ou Cq-
(AF12)



46,XY, Cp-
(AF13)

Figura 3. Metáfases com cromossomos portadores de deficiências parciais.

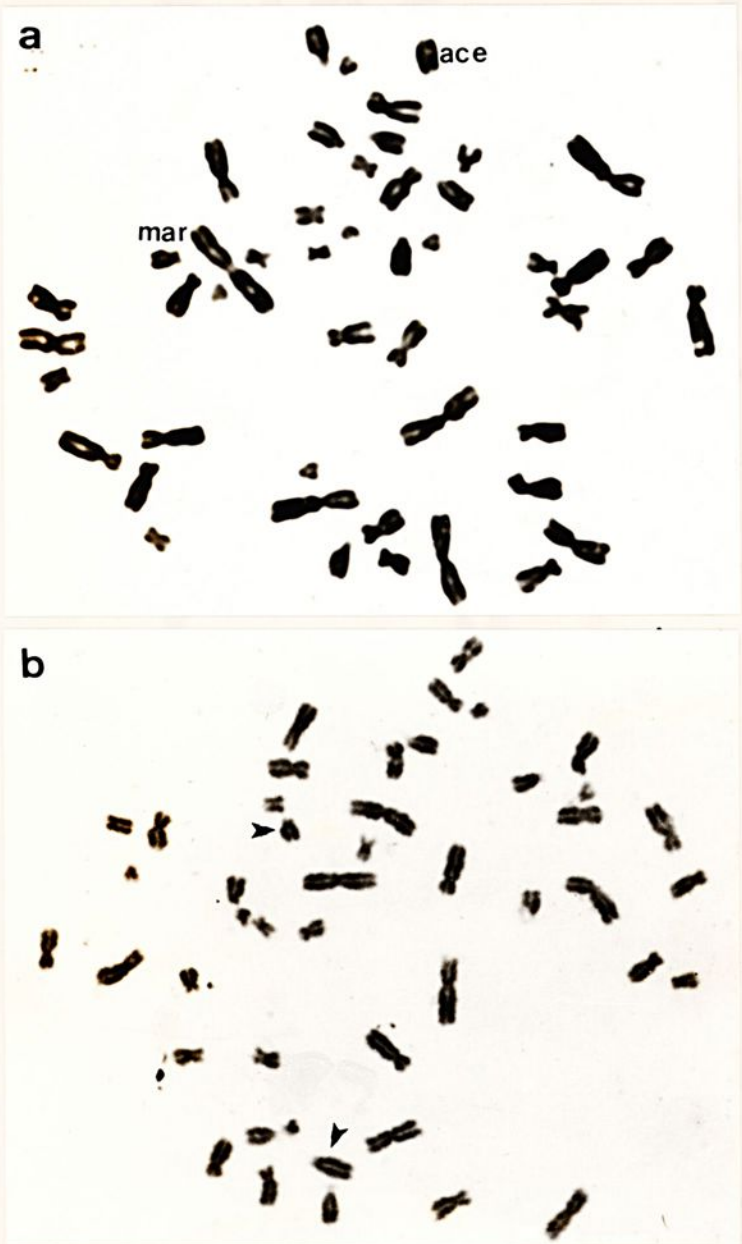


46,XY, -C, +mar
ou Cq-
(AF14)

46,XY, -C, +mar
ou Cq-
(ANF7)

46,XY, -C, +mar
ou Cq-
(CF2)

Figura 4. Metáfases com cromossomos portadores de deficiências parciais.



46,XY, -B, +mar,
+ ace

(AF3)

46,XY, -F, +mar

(AF16)

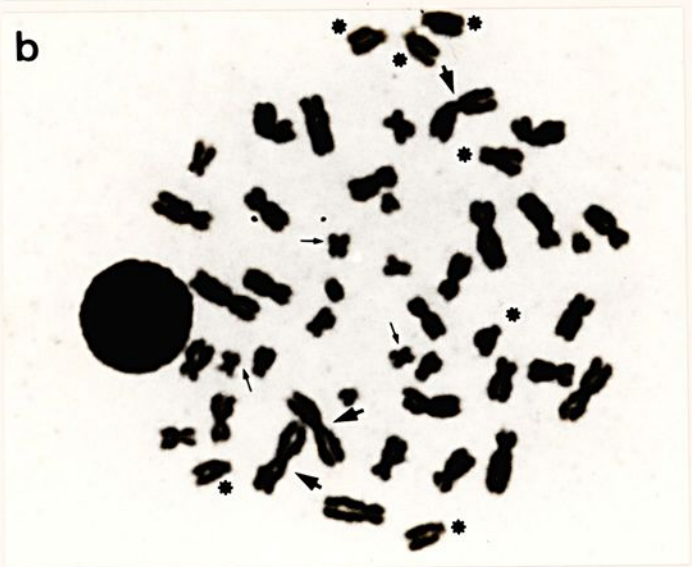
Figura 5. Metáfases com rearranjos não identificados.



Figura 6. Metáfases com cariótipo 46,XY, +ace encontradas em AF11 (a), AF13(b), AF16(c) e CF5(d).



46,XY, -D, +mar,
+ace, 1p+ ou q+
(ANF7)



48,XY, -F, +1, +B,
+D
(ANF13)



46,XY, -1, +Bq+
ou inv(1)
(CF1)

Figura 7. Metáfases com rearranjos.

Tabela 8. Frequências absolutas (FA) e relativas (FR) de quebras e falhas cromatídicas e cromossômicas, nas amostras de aplicadores (A) e controles (C).

Subamostra	Elemento afetado	Quebras		Falhas		Total	
		FA	FR	FA	FR	FA	FR
AF	cromossomo	14	0,40	1	0,03	**15**	**0,43**
	cromátide	9	0,26	11	0,31	**20**	**0,57**
	cromos. + cromat.	**23**	**0,66**	**12**	**0,34**	**35**	**1,00**
ANF	cromossomo	7	0,25	5	0,18	**12**	**0,43**
	cromátide	9	0,32	7	0,25	**16**	**0,57**
	cromos. + cromat.	**16**	**0,57**	**12**	**0,43**	**28**	**1,00**
CF	cromossomo	6	0,46	3	0,23	**9**	**0,69**
	cromátide	1	0,08	3	0,23	**4**	**0,31**
	cromos. + cromat.	**7**	**0,54**	**6**	**0,46**	**13**	**1,00**
CNF	cromossomo	9	0,30	3	0,10	**12**	**0,40**
	cromátide	8	0,27	10	0,33	**18**	**0,60**
	cromos. + cromat.	**17**	**0,57**	**13**	**0,43**	**30**	**1,00**
A	cromossomo	21	0,33	6	0,09	**27**	**0,43**
	cromátide	18	0,29	18	0,29	**36**	**0,57**
	cromos. + cromat.	**39**	**0,62**	**24**	**0,38**	**63**	**1,00**
C	cromossomo	15	0,35	6	0,14	**21**	**0,49**
	cromátide	9	0,21	13	0,30	**22**	**0,51**
	cromos. + cromat.	**24**	**0,56**	**19**	**0,44**	**43**	**1,00**

Tabela 9. Valores de Z para comparação das distribuições das frequências de quebras e de falhas, assim como de eventos cromossômicos e de eventos cromatídicos, em cada subamostra ou amostra. Q: quebras; F: falhas; *: P<0,05.

Amostra	Valores de Z	
	Q x F	Cromossomo x cromátide
AF	2,00*	0,84
ANF	0,75	0,75
CF	0,29	1,48
CNF	0,77	1,12
A	1,97*	1,12
C	0.79	0,13

Tabela 10. Distribuição das frequências absolutas (FA) e relativas(FR) de quebras e falhas por cromossomo ou grupo cromossômico, nas amostras de aplicadores (A) e controles (C).

Amostra	Frequência	Cromossomo ou grupo cromossômico									Total
		1	2	3	B	C+X	D	E	F	G+Y	
A	FA	5	9	3	14	23	8	1	0	0	63
	FR	0,08	0,14	0,05	0,22	0,36	0,13	0,01	0	0	1,00
C	FA	7	3	3	6	17	4	3	0	0	43
	FR	0,16	0,07	0,07	0,14	0,39	0,09	0,07	0	0	1,00
Tamanho relativo ao lote 2n*	FA	16,88	16,04	13,66	24,76	74,82	21,52	19,08	10,46	10,03	207,25
	FR	0,08	0,08	0,07	0,12	0,36	0,10	0,09	0,05	0,05	1,00

* Com base em LUBS **e col.** (ISCN, 1978)

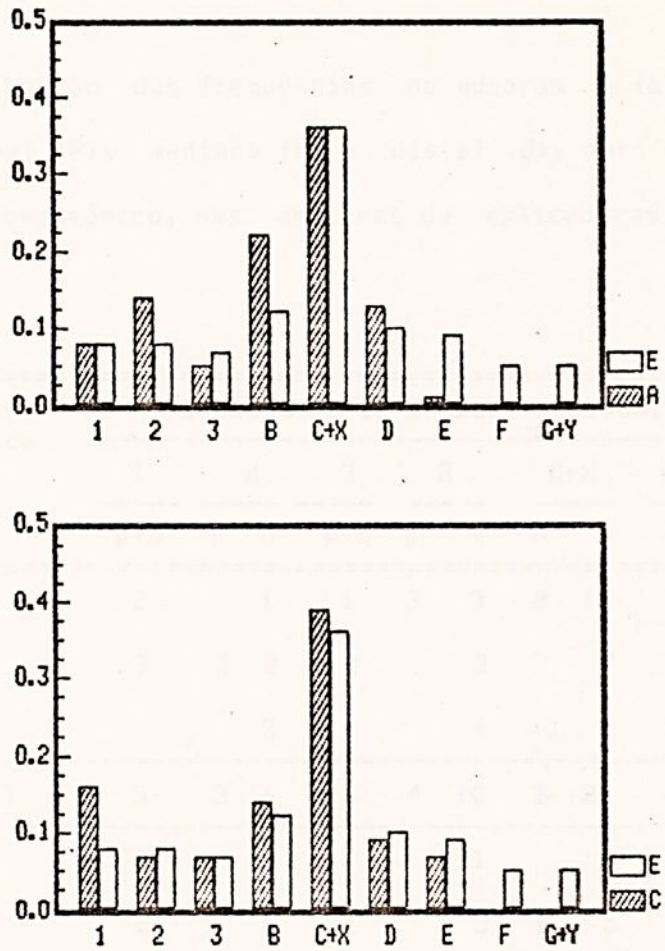


Figura 8. Distribuição das frequências relativas de quebras e falhas por cromossomo ou grupo cromossômico: a) encontradas nas amostras de aplicadores (A) e b) controles (C) e esperadas com base no tamanho relativo dos cromossomos (E), segundo LUBS **e col.** (ISCN, 1978).

Tabela 11. Distribuição das frequências de quebras e falhas nas regiões proximal (P), mediana (M) e distal (D), por cromossomo ou grupo cromossômico, nas amostras de aplicadores (A) e controles (C).

Amostra	Região cromossômica	Cromossomo ou grupo cromossômico										Total	
		1	2		3	B		C+X		D	E	FA	FR
		p+q	p	q	p+q	p	q	p	q	q	q		
A	P	2		1	1	3	3	2	12			24	0,38
	M	3	3	2	2	1	3		7	5	1	27	0,43
	D			3			4		2	3		12	0,19
	Total	5	3	6	3	4	10	2	21	8	1	63	1,00
C	P	3		1	2		1		9			16	0,37
	M	2		2	1		3	1	5	3		17	0,40
	D	2		2	1		2		2	1		10	0,23
	Total	7		3	3		6	1	16	4		43	1,00

Tabela 12. Frequências de TCI em 50 células de cada indivíduo das amostras de aplicadores fumantes (AF), aplicadores não-fumantes (ANF), controles fumantes (CF) e controles não-fumantes (CNF).

Subamostra	Indivíduo	No. de TCI	TCI/célula X	TCI/célula S	Limites das freq. TCI/cel. Mínimo	Máximo	Amplitude
AF	1	765	15,30	3,61	7	22	15
	2	683	13,66	4,51	4	24	20
	3	732	14,64	3,98	7	25	18
	4	566	11,32	5,09	3	22	19
	5	635	12,70	4,17	4	23	19
	6	703	14,06	4,17	7	24	17
	7	1091	21,80	6,75	10	44	34
	8	817	16,34	4,90	6	25	19
	9	732	14,64	4,80	5	24	19
	10	1175	23,50	5,99	9	36	27
	11	623	12,46	5,24	4	24	20
	12	527	10,54	3,68	5	20	15
	13	464	9,28	4,57	2	28	26
	14	582	11,64	5,30	3	30	27
	15	407	8,14	3,39	2	18	16
	16	800	16,00	4,17	7	25	18
	Total		14,13	4,64	2	44	42
ANF	1	696	13,92	4,47	7	25	18
	2	810	16,20	4,24	9	29	20
	3	607	12,14	3,65	2	20	18
	4	1075	21,50	4,51	12	30	18
	5	604	12,08	4,32	3	21	18
	6	672	13,44	3,52	5	25	20
	7	668	13,36	4,15	5	21	16
	8	498	9,96	4,10	4	20	16
	9	629	12,58	6,18	4	32	28
	10	655	13,10	4,99	5	29	24
	11	528	10,56	3,80	5	19	14
	12	420	8,40	3,49	2	15	13
	13	654	13,08	4,27	4	25	21
	Total		13,10	4,30	2	32	30
CF	1	659	13,18	4,48	7	23	16
	2	1159	23,18	5,44	7	33	26
	3	856	17,12	5,34	7	30	23
	4	920	18,40	5,40	8	29	21
	5	444	8,88	3,43	3	16	13
	Total		16,15	4,82	3	33	30
CNF	1	694	13,88	4,49	7	23	16
	2	699	13,98	4,60	7	27	20
	3	533	10,66	3,66	4	18	14
	4	369	7,38	3,19	1	16	15
	5	758	15,16	5,01	6	32	26
	6	956	19,12	4,09	10	30	20
	7	412	8,24	4,23	1	21	20
	8	762	15,24	3,88	8	29	21
	9	709	14,18	3,89	7	23	16
	10	643	12,86	4,11	4	21	17
	11	692	13,84	3,81	6	21	19
	12	700	14,00	4,04	6	23	17
	13	794	15,88	5,47	7	33	26
	14	624	12,48	3,61	5	20	15
	15	487	9,74	4,16	3	23	20
	Total		13,11	4,15	1	33	32

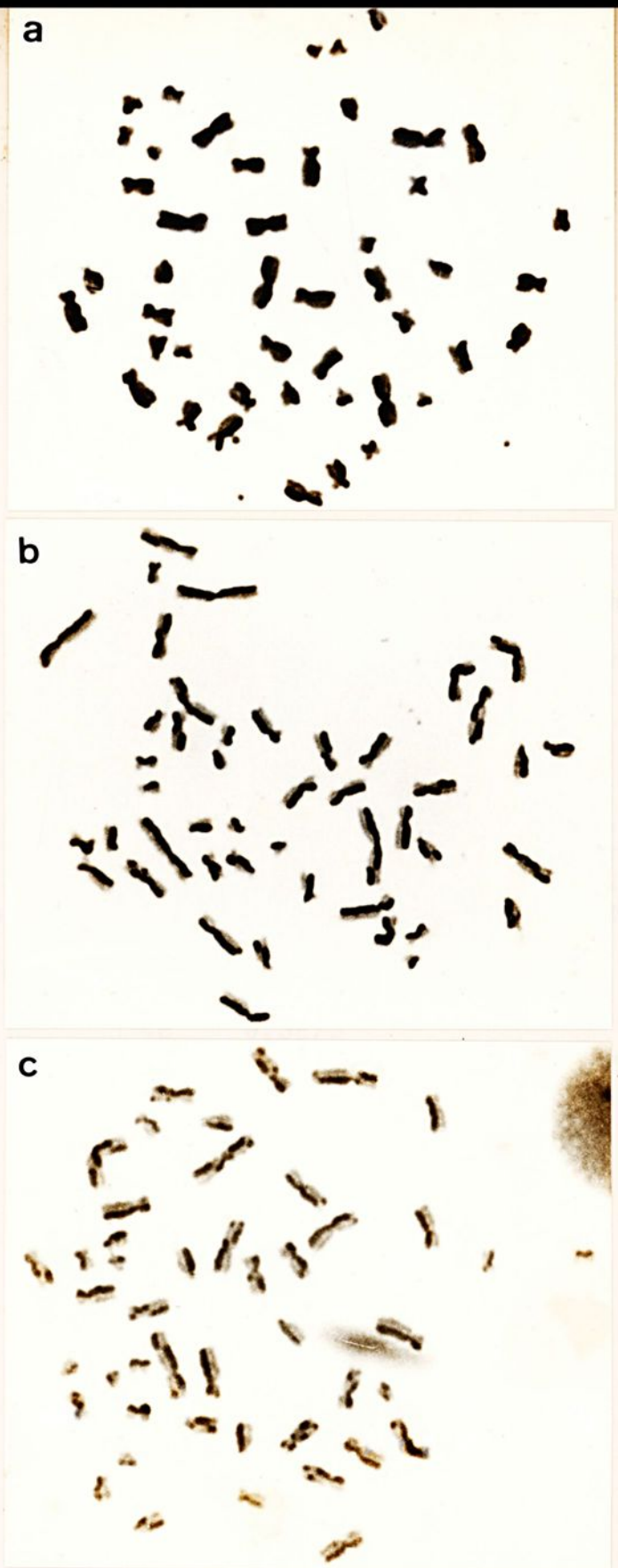


Figura 9. Trocas entre cromátides-irmãs: (a) metáfases com 3 TCI, (b) metáfase com 23 TCI, (c) metáfase com 39 TCI.

Tabela 13. Análise de variância para comparação das frequências transformadas de TCI entre as subamostras de AF, ANF, CF e CNF. NS: P> 0,05.

FV	GL	SQ	QM	F	
Submostra	03	0,00196	0,0065	0,95	NS
Resíduo	45	0,5351	0,0068		
Total	48	0,3273			

Tabela 14. Distribuição das frequências de TCI por cromossomo ou grupo cromossômico nas amostras de aplicadores (A) e controles (C) e valores de qui-quadrado da comparação com as frequências casualmente esperadas com base no tamanho relativo dos cromossomos. O: observada; E: esperada; * :P< 0,05.

Amostra	Distribuição	Cromossomo ou grupo cromossômico											Valores de qui-quadrado*
		1	2	3	B	C+X	D	16	17+18	F	G+Y	Total	
A	O	1683	1899	1432	2961	7450	2063	466	862	492	509	19817	867,5*
	E**	1614,0	1533,7	1306,2	2367,5	7154,2	2057,7	642,6	1181,9	1000,2	959,1	19817	
C	O	1201	1270	1003	2079	5090	1434	333	681	412	364	13870	360,7*
	E**	1129,7	1073,5	914,2	1657	5007,2	1440,2	449,7	827,2	700,0	671,2	13870	

** Calculado de acordo com LUBS e col.(ISCN, 1978)

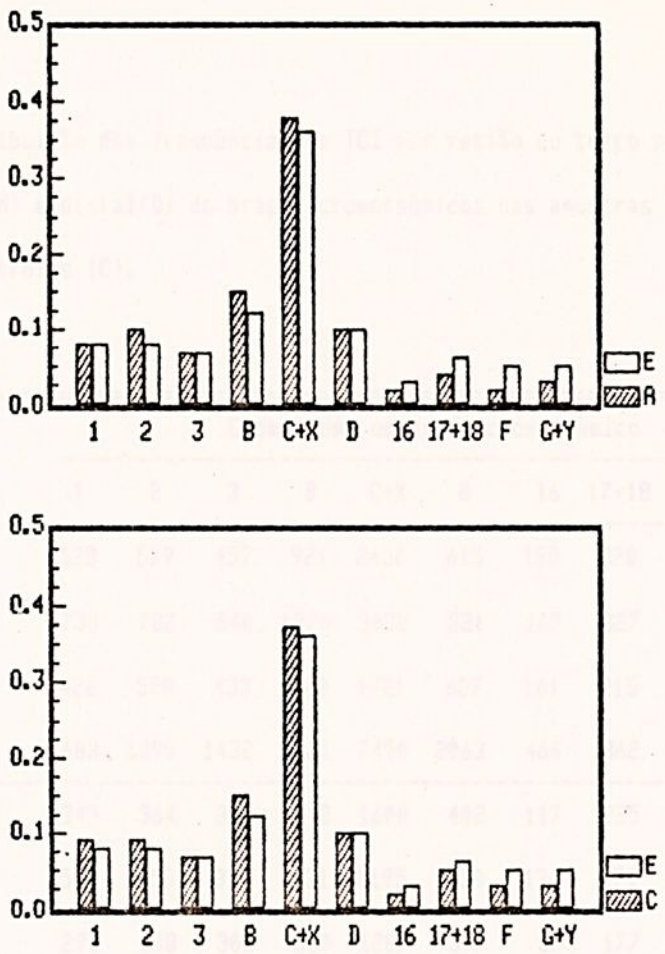


Figura 10. Distribuição das frequências relativas de TCI por cromossomo ou grupo cromossômico nas amostras: a) de aplicadores (A) e b) controles (C) e as teoricamente esperadas com base ao tamanho relativo dos cromossomos (E), segundo LUBS **e col.**(ISCN, 1978).

Tabela 15. Distribuição das frequências de TCI por região do terço proximal (P), mediano (M) e distal(D) do braços cromossômicos nas amostras de aplicadores (A) e controles (C).

Amostra	Região	Cromossomo ou grupo cromossômico										Total
		1	2	3	B	C+X	D	16	17+18	F	G+Y	
A	P	528	579	459	921	2456	615	198	320	173	144	6393
	M	733	782	540	1220	3082	821	167	327	211	240	8123
	D	422	528	433	820	1921	627	101	215	108	125	5301
	Total	1683	1899	1432	2961	7450	2063	466	862	492	509	19817
C	P	343	364	322	618	1608	402	117	225	121	87	4207
	M	567	558	378	931	2195	638	134	279	183	185	6048
	D	291	348	303	530	1287	397	82	177	108	92	3615
	Total	1201	1270	1003	2079	5090	1437	333	681	412	364	13870

IV- DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

No presente estudo não foram encontradas diferenças nas frequências de metáfases totais com aberrações cromossômicas entre as subamostras de aplicadores de inseticidas fumantes (3,50% de metáfases anômalas) e não-fumantes (3,38% de metáfases anômalas), nem entre os controles fumantes (3,60% de metáfases anômalas) e os não-fumantes (2,40% de metáfases anômalas). Igualmente, as frequências de metáfases com aberrações cromossômicas nas amostras de aplicadores (3,45%) e de controles (2,70%) não diferiram significativamente.

No entanto, vários estudos que são sumarizados na Tabela 16 e que serão analisados mais detalhadamente a seguir, foram desenvolvidos em indivíduos expostos a inseticidas acidentalmente, intencionalmente (por tentativas de suicídio) ou ocupacionalmente (em operários de indústrias de formulação e trabalhadores rurais) e referiram a ocorrência de frequências aumentadas de aberrações cromossômicas.

A clastogenicidade dos organofosforados diazinon, diclorvós, dimetoato, malation, mefinvós, paration metílico e triclorfon foi referida por VAN BAO **e col.** (1974) em 31 indivíduos intoxicados, dos quais 22 por tentativa de suicídio e 9 por exposição dérmica e respiratória, em decorrência da não utilização de medidas de segurança para proteção individual durante a manipulação ocupacional desses inseticidas. A análise de linfócitos, cultivados por 48 horas, indicou a ocorrência de frequências

Tabela 16. Avaliação citogenética em trabalhadores expostos a inseticidas ocupacionalmente ou de outras formas.

Referências	Exposição	Inseticidas	Número de indivíduos analisados(expostos/ controles)	Duração das culturas	Resultados	
					Ab. crom.	TCI
YODER e col. (1973)	uso agrícola	OF, OC	16/16	48	+	
RABELLO e col. (1975)	formulação	OC	58/10	72	+	
KIRALY e col. (1979)	formulação	OF	90/49	48	+	
STOCCO e col. (1982)	formulação	OF	15/13	72	-	
CID & MATOS (1983)	formulação	OF, OC	22/20	72		-
DULOUT e col. (1985)	uso agrícola	OF, OC, Ca	36/15	72	+	
PALDY e col. (1987)	uso agrícola	OF, OC, Ca, Pi	80/24	72	+	
RITA e col. (1987)	uso agrícola	OF, OC	15/10	72	+	
RUPA e col. (1988)	uso agrícola	OF, OC	25/30	72	+	+
RUPA e col. (1989a)	uso agrícola	OF, OC, Ca, Pi	50/47	72	+	
RUPA e col. (1989b)	uso agrícola	OF, OC, Ca, Pi	52/25	72	+	
RUPA e col. (1989c)	uso agrícola	OF, OC, Ca, Pi	50/47	72		+
Presente estudo	desinsetização	OF, OC, Ca, Pi	29/20	72	-	-
VAN BAO e col. (1974)	intencional	OF	22/15	48	+	
LARRIPA e col. (1983)	acidental	OF	20/10	72		+

OF= organofosforados; OC= organoclorados; Ca= carbamatos; Pi= piretroides

significativamente elevadas de eventos anômalos nas amostras coletadas em três épocas: imediatamente após, um mês após e seis meses após a intoxicação.

Estudos com operários de fábricas foram realizados por RABELLO **e col.** (1975), KIRALY **e col.** (1979) e STOCCO **e col.** (1982). RABELLO **e col.** (1975) estudaram 50 operários de três fábricas brasileiras de inseticidas, dos quais 25 tiveram contato direto com o organoclorado DDT por 2 meses a 10 anos e 25 trabalharam nas mesmas fábricas de 1 mês a 19 anos, sem terem exposição direta aos compostos (controle II), e 10 indivíduos sem qualquer exposição ao DDT (controle I). Pela análise das frequências de aberrações cromossômicas, em culturas de 72 horas, não foi observada correlação significativa entre as frequências de células com aberrações cromossômicas estruturais e numéricas e os níveis de DDT no plasma. Porém, a concentração de DDT encontrada no plasma apresentou correlação positiva com a duração de exposição. O nível médio de DDT no plasma do grupo diretamente exposto foi de 0,24 ug/ml, no controle II foi de 0,38 ug/ml e o nível mais baixo foi encontrado no controle I, de 0,03 ug/ml. O elevado nível médio de DDT apresentado pelo controle II foi devido a 5 indivíduos, que por essa razão foram transferidos para o grupo de trabalhadores com exposição direta. A frequência de células com aberrações cromossômicas nos expostos, após a redistribuição dos indivíduos pelas amostras, foi significativamente aumentada (12%) quando comparada à dos controles II (8%) e I (2,2%).

O estudo anteriormente referido não fez comentários sobre a utilização de dispositivos de segurança durante o manuseio dos

compostos, porém KIRALY **e col.** (1979), em uma investigação com operários de uma fábrica da Hungria, referiram que os grupos constituídos de 34 indivíduos empregados na produção dos organofosforados diazinon, de 25 empregados na produção de fosmet e de 17 empregados na produção de triclorfon trabalhavam oito horas ao dia, há pelo menos seis meses, com uso de máscaras faciais e ventilação forçada no local de trabalho. Nessa pesquisa, os controles foram constituídos de uma amostra sem qualquer vínculo com a fábrica (controle I) e outra com pessoal da própria fábrica mas sem contato direto com os inseticidas, como engenheiros, técnicos e funcionários administrativos (controle II). Após culturas de 48 horas, foram obtidas frequências significativamente aumentadas de aberrações cromossômicas em linfócitos, tanto nos trabalhadores que manipulavam diretamente os inseticidas, como nos que não tinham contato direto com essas substâncias (controle II). Esse estudo, assim como o de RABELLO **e col.** (1975), mostraram que indivíduos que trabalham em fábricas de inseticidas podem se contaminar, mesmo se não tiverem contato direto com essas substâncias.

Por outro lado, STOCCO **e col.** (1982) estudaram amostras de sangue de 15 operários brasileiros, todos do sexo masculino, que estiveram cronicamente expostos ao organofosforado paration metílico. A idade média do grupo exposto foi 27,7 $\pm$ 7,8 anos e o tempo de exposição ao inseticida variou de 1 semana a 7 anos, mas com períodos intercalados de não-exposição. O grupo controle foi constituído de 13 homens sem quaisquer exposição profissional a compostos químicos, com idade média de 25,0 $\pm$ 6,2 anos e nível

sócio-econômico aproximado aos dos expostos. Não foi feita referência quanto a utilização ou não de dispositivos de segurança durante a manipulação do composto. Não foram encontradas frequências aumentadas de aberrações cromossômicas nos operários expostos, em relação ao seu grupo controle.

Inúmeros estudos citogenéticos foram desenvolvidos com trabalhadores agrícolas expostos à inseticidas. YODER **e col.** (1973), por exemplo, investigaram as frequências de aberrações cromossômicas, em linfócitos cultivados por 48 horas, em 42 trabalhadores agrícolas dos Estados Unidos, todos do sexo masculino, expostos ocupacionalmente a pesticidas durante 25 anos. Parte desses trabalhadores foram expostos a herbicidas. Outra parte, constituída por 16 formuladores, operadores de pulverização ou agricultores, com idade média de 42,3 anos, foram expostos por cerca de 12 anos a vários inseticidas, entre os quais os mais utilizados foram os organofosforados demeton, naled, paration etílico e triclorfon. As amostras de sangue dessas pessoas foram coletadas em duas situações diferentes: a primeira quando os aplicadores não estavam expostos aos inseticidas por um período de, no mínimo, 30 dias, e a segunda durante o pico de aplicação, nos meses de julho a agosto. Os controles e expostos não diferiram entre si na primeira situação, mas as aberrações cromossômicas foram consideravelmente mais frequentes nos expostos do que nos controles, durante o período de pulverização intensa.

Um extenso estudo epidemiológico foi feito por DULOUT **e col.** (1985) em 154 indivíduos de uma comunidade rural da Argentina, que se dedicavam a floricultura por no mínimo 10 anos. Eles

trabalhavam em casas adaptadas ao cultivo de plantas e não usavam dispositivos de proteção durante ou após as pulverizações. Eram utilizados principalmente compostos das classes dos organofosforados, como dimetoato, mevinfós, monocrotofós, paration, paration metílico, e dos carbamatos, como aldicarb, diazomet, maneb, propineb, zineb; menos frequentemente eram também empregados compostos organoclorados, como aldrin, endosulfan e heptacloro. Após a análise epidemiológica, foram estratificadas para o estudo citogenético, por idade e por sexo, duas amostras de trabalhadores: uma constituída por 21 indivíduos com sintomas de intoxicação crônica e outra por 15 indivíduos sem sintomas de intoxicação. Um grupo controle de 15 indivíduos saudáveis e sem exposição ocupacional a pesticidas foi usado para a comparação dos resultados obtidos pelas análises de aberrações cromossômicas estruturais. Os autores concluíram que os sintomas de intoxicação crônica não estavam associados à frequência de aberrações cromossômicas instáveis do tipo dicêntricos encontradas nas culturas de linfócitos periféricos de 72 horas. Porém, as frequências desses eventos foram significativamente mais elevadas em ambos os grupos de expostos, quando comparados ao controle.

PALDY **e col.** (1987) coletaram amostras de sangue de 80 trabalhadores da área rural da Hungria com contato profissional com vários pesticidas, incluindo piretróides, organofosforados, organoclorados e carbamatos. Evidenciou-se, do estudo citogenético em linfócitos cultivados por 72 horas, uma correlação positiva entre o aumento das frequências de aberrações cromossômicas e a duração da exposição, por até 15 anos. A partir dos 15 anos de exposição, as

taxas de aberrações não aumentaram proporcionalmente, mas sempre permaneceram significativamente mais elevadas que a dos controles.

Na Índia também foram observados aumentos significativos nas frequências de aberrações cromossômicas em trabalhadores agrícolas expostos a várias classes de inseticidas. RITA **e col.** (1987) analisaram trabalhadores rurais, tanto mulheres como homens, expostos por um período de 5 a 12 anos a vários compostos, entre os quais os organofosforados demeton-S-metílico, diclorvós, paration e quinalfós, e os organoclorados BHC, DDT e dieldrin. Nesse estudo não havia referências quanto ao uso ou não de medidas de segurança durante a aplicação dos inseticidas. Os resultados da análise citogenética, em linfócitos cultivados por 72 horas, indicaram um aumento da frequência de aberrações cromossômicas nos trabalhadores expostos em comparação aos 15 indivíduos do grupo controle, que tinham idade e nível sócio-econômico aproximados aos dos aplicadores.

RUPA **e col.** (1988) coletaram amostras de sangue periférico de 25 horticultores do sexo masculino, expostos oito horas por dia, sem dispositivos de proteção, aos organofosforados dimetoato, fenitrotion, malation e paration e aos organoclorados BHC e DDT. Todos ingeriam rotineiramente bebidas alcoólicas e tinham o hábito de fumar durante as pulverizações. Após o cultivo dos linfócitos por 72 horas, foi detectada frequência aumentada de eventos cromossômicos anômalos nos trabalhadores expostos. Outros estudos, realizados pelos mesmos autores, também obtiveram resultados semelhantes. Em um deles (RUPA **e col.**, 1989a) foram investigados 50 trabalhadores fumantes, e em outro (RUPA **e col.**, 1989b) 52

trabalhadores não-fumantes, todos expostos a vários inseticidas, principalmente das classes dos organoclorados, organofosforados e piretróides, durante a preparação e pulverização dos inseticidas em plantações de algodão. Esses indivíduos trabalhavam oito horas por dia durante nove meses por ano (de março a julho) e não usavam qualquer dispositivo de proteção durante a pulverização. O tempo de cultivo de 72 horas foi utilizado para a avaliação das ocorrências de aberrações cromossômicas em linfócitos, sendo verificado que a frequência de anomalias foi significativamente maior nos aplicadores que nos controles não-expostos, em ambos os estudos.

Os resultados do presente estudo, portanto, não coincidem com os da maioria dos demais anteriormente citados, exceto o de STOCCO **e col.** (1982) e, aparentemente, poderiam sugerir que a exposição a qual a amostra de aplicadores em análise está submetida não está exercendo efeitos genotóxicos. Contudo, conclusões muito diferentes surgem da análise mais detalhada dos dados. Neste estudo, assim como em praticamente todos os outros anteriormente referidos, os eventos anômalos mais frequentes nas amostras de indivíduos expostos foram as quebras e falhas. Essas lesões são produzidas por agentes que quebram o esqueleto de DNA ou distorcem fortemente a hélice e que, em muitos casos, são reparadas antes que seja completado o processo de divisão celular. No caso de exposições agudas a níveis elevados de agentes químicos ou físicos, verificam-se claras diferenças nas frequências desses tipos de lesões entre as amostras expostas e não-expostas. No entanto, essas lesões podem não se manter por muito tempo: elas podem ser reparadas pelo eficiente sistema celular em células na fase estacionária ou

podem ser reparadas ou perdidas na progênie das células em que ocorreram, se estas entrarem em divisão.

No caso da amostra em estudo, como os indivíduos foram expostos por muitos anos, mas de forma esporádica ao longo do ano, eles poderiam ser classificados como expostos cronicamente em grau moderado. Além disso, foram analisados linfócitos cultivados por 72 horas, que compreendem geralmente células em segundo ou terceiro ciclo de divisão após o estímulo mitogênico. Por isso, outras alterações cromossômicas, que sejam mais persistentes e equilibradas devem ser melhores indicadores do real efeito genotóxico exercido pelos inseticidas. E neste estudo, a frequência de anomalias cromossômicas estruturais, excluídas falhas e quebras, é maior nos aplicadores de inseticidas que nos controles.

As aberrações cromossômicas podem ser classificadas como estáveis ou instáveis, em função de sua capacidade de persistirem nas células em divisão (CARRANO & NATARAJAN, 1988). As aberrações do tipo instável, que consistem nos rearranjos assimétricos como os cromossomos dicêntricos, anéis, fragmentos e as figuras trirradiais, podem até levar à morte celular, impedindo que as células se dividam ou pela perda de material genético durante a divisão celular. As translocações balanceadas, as inversões e os outros tipos de rearranjos simétricos são consideradas aberrações estáveis, porque podem ser transmitidas para as células filhas durante a divisão.

As culturas de linfócitos, mantidas por 72 horas, geralmente contêm a maioria das células em segundo ou terceiro ciclo de divisão, e a seleção e multiplicação diferencial, que ocorrem

entre os linfócitos com danos cromossômicos e os normais, podem ter ocultado a verdadeira frequência de células anômalas. Por isso, tem sido sugerido por vários investigadores, como ERICH & GEBHART (1982), que a análise citogenética seja feita em culturas de 48 horas, nas quais a maioria dos linfócitos pode ser encontrada ainda na primeira divisão celular. As frequências resultantes dessa análise seriam altamente representativas de danos cromossômicos **in vivo**. No entanto, GEBHART **e col** (1980) e SINHA **e col.** (1984), entre outros autores, verificaram que apesar das células em primeira divisão apresentarem frequências mais altas de aberrações cromossômicas, nas culturas de indivíduos expostos a agentes genotóxicos, as de segunda e terceira divisão ainda contêm taxas de aberrações acima das encontradas nos controles. Somando a isso o fato de que o índice mitótico é muito maior nas culturas de 72 horas, muitos investigadores têm optado por desenvolverem estudos com a metodologia ora utilizada.

Os rearranjos estáveis encontrados podem representar eventos que persistiram nas células em cultura. Os fragmentos, muitos dos quais de grande tamanho, devem ter derivado de eventos anômalos ocorrentes anteriormente à divisão celular. Do mesmo modo, os cromossomos com deficiências e os marcadores, alguns dos quais também podem ser interpretados como cromossomos portadores de deficiências, devem ter resultado de fenômenos ocorrentes em etapas anteriores e que não inviabilizaram a sobrevivência celular.

As frequências das lesões cromossômicas estáveis e instáveis, quando detalhadas nos outros estudos com indivíduos expostos a inseticidas, também mostraram variações interessantes.

VAN BAO **e col.** (1974), que analisaram células cultivadas por 48 horas, encontraram frequências significativamente aumentadas de aberrações cromossômicas do tipo instável, como fragmentos, cromossomos em anel e dicêntricos, e do tipo estável, como deficiências e translocações. Os resultados de KIRALY **e col.** (1979), também em culturas de 48 horas, são concordantes com o anterior. As aberrações cromossômicas instáveis foram mais frequentes nos trabalhadores expostos aos pesticidas que nos controles, e alterações estruturais estáveis, como inversões, translocações e deficiências, foram mais frequentes entre os manipuladores dos organofosforados diazinon e triclorfon, mas não entre os manipuladores do organofosforado fosmet.

Em culturas de 72 horas, também foram detectadas frequências aumentadas de alguns desses tipos de anomalias. DULOUT **e col.** (1985) encontraram frequência de cromossomos dicêntricos mais elevada nos floricultores que nos controles, mas não de fragmentos acêntricos. Esses autores destacaram que o dano real poderia ser mais elevado do que o detectado, pelo fato de terem analisado linfócitos cultivados por 72 horas. Frequências moderadamente elevadas de cromossomos com deficiências, que aumentaram com a duração do tempo de exposição até 15 anos, mas não de fragmentos acêntricos e cromossomos dicêntricos, foram encontrados por PALDY **e col.** (1987) nas amostras de aplicadores, e frequências mais elevadas de fragmentos acêntricos e cromossomos dicêntricos nos trabalhadores expostos que nos controles foram observados também por RUPA **e col.** (1988, 1989a,b). Porém, STOCCO **e col.** (1982) não encontraram diferenças entre os indivíduos expostos e não-expostos

em relação à frequência de eventos instáveis.

As aberrações cromossômicas estáveis, como deficiências e rearranjos simétricos (translocações e inversões) foram encontradas em frequências altas em células cultivadas por 48 horas dos indivíduos expostos aos inseticidas (VAN BAO **e col.**, 1974; KIRALY **e col.**, 1979). Já as culturas de 72 horas mostraram frequências mais baixas de eventos estáveis, apesar dessas serem também mais elevadas nos expostos que nos controles. Desse grupo, os eventos mais comuns foram as deficiências cromossômicas.

O achado de determinadas aberrações cromossômicas em frequências mais elevadas nos expostos que nos controles, no presente trabalho, significa que um considerável número de células com eventos anômalos foi mantido, mesmo após o primeiro ou segundo ciclo celular. Por isso, é possível que se a investigação dessas mesmas anomalias tivesse sido feita em culturas de 48 horas, fossem encontradas frequências mais elevadas de células anômalas nos aplicadores, pelo fato de que parte dos eventos anômalos que podem ser identificados em células que estão em primeira divisão são, indubitavelmente, perdidos nos ciclos seguintes. Além disso, deve-se ressaltar que parte das lesões pode não ter sido detectada, em decorrência de não terem sido usadas técnicas de bandamento que permitissem a identificação de cada par cromossômico. Por isso, inversões paracêntricas, assim como inversões pericêntricas, translocações, inserções ou deficiências, que não alterassem inequivocamente a morfologia dos cromossomos, não foram identificadas.

Um fator que poderia potenciar os efeitos dos inseticidas

absorvidos pelos organismos dos aplicadores, nas culturas **in vitro** de seus linfócitos, seria a utilização do soro dos próprios aplicadores na suplementação do meio de cultura. Isso não foi feito neste estudo, onde se utilizou soro AB humano filtrado, mas também não foi feito em outros estudos que detectaram frequências elevadas de aberrações cromossômicas nas células analisadas. Alguns pesquisadores utilizaram meios de cultura suplementados com soro AB humano (RUPA **e col.**, 1988, 1989a,b e c) e outros com soro fetal bovino (CID & MATOS, 1983; LARRIPA **e col.**, 1983; DULOUT **e col.**, 1985; PALDY **e col.**, 1987).

Um outro aspecto a ser destacado nesta discussão é o relativo ao efeito do uso de cigarros. Não se detectou correlação entre as frequências de células com aberrações cromossômicas e o consumo diário de cigarros nos aplicadores de inseticidas ou nos controles fumantes. No entanto, os controles fumantes apresentaram elevada frequência de aberrações estruturais designadas como "outras" neste estudo, provavelmente só não tendo sido detectadas diferenças significativas entre as subamostras de fumantes e não-fumantes na amostra controle ($Z = 1,80$; $P > 0,05$) devido ao pequeno número de indivíduos que compunham a subamostra de fumantes. Essa hipótese é reforçada pelo fato de que as frequências de células com e sem anomalias entre as subamostras de aplicadores não-fumantes e controles não-fumantes diferem entre si (qui-quadrado= 4,65; g.l.= 1; $P < 0,05$), mas não há diferença entre as subamostras de aplicadores fumantes e não-fumantes (qui-quadrado= 0,01; g.l.= 1; $P < 0,05$). Tais resultados sugerem, também, que não houve sinergismo entre os efeitos do cigarro e dos inseticidas na amostra em análise.

Autores que investigaram outras amostras populacionais, como por exemplo RUPA **e col.** (1988 e 1989b), encontraram frequências significativamente elevadas de células com aberrações cromossômicas nos controles fumantes (3,65% e 3,76%) quando comparados com os controles não-fumantes (1,60% e 0,55%). Tais resultados também concordam com os obtidos por OBE **e col.** (1982) e LITTLEFIELD & JOINER (1986), que detectaram um efeito clastogênico do cigarro em linfócitos do sangue periférico de indivíduos fumantes, pela análise de aberrações cromossômicas.

Neste estudo, as frequências de anomalias cromossômicas estruturais do tipo quebras e falhas não diferiram significativamente entre as amostras de aplicadores e controles. No entanto, nos aplicadores as quebras foram mais frequentes que as falhas, enquanto que na amostra controle as frequências desses dois eventos foram iguais. VAN BAO **e col.** (1974) e RITA **e col.** (1987) obtiveram resultados semelhantes a esses, enquanto as frequências de quebras foram maiores ou iguais às de falhas tanto nos expostos como nos respectivos controles em outras investigações (YODER **e col.**, 1973; RABELLO **e col.**, 1975; KIRALY **e col.**, 1979; PALDY **e col.**, 1987; RUPA **e col.**, 1988, 1989a,b).

Verificou-se também, por este estudo, que os aplicadores de inseticidas e os controles apresentaram lesões do tipo cromatídico em iguais proporções às lesões do tipo cromossômico. No entanto, tanto nos estudos em células cultivadas por 48 horas (YODER **e col.**, 1973; VAN BAO **e col.**, 1974; KIRALY **e col.**, 1979), como nos desenvolvidos em células cultivadas por 72 horas (RABELLO **e col.**, 1975; DULOUT **e col.**, 1985; PALDY **e col.**, 1987; RITA **e col.**, 1987;

RUPA **e col.**, 1988, 1989a,b) os eventos do tipo cromatídico foram mais frequentemente encontrados nos indivíduos expostos a vários inseticidas. Deve-se considerar, em relação a esse aspecto, que as lesões cromatídicas que se manifestam no segundo ou terceiro ciclos de divisão ocorreram durante o período de cultivo, refletindo, portanto, as condições **in vitro**. Além disso, mesmo as lesões cromossômicas também podem ter derivado de lesões cromatídicas ocorrentes nas culturas. Essas são outras razões pelas quais as frequências desses eventos, nas condições em que eles foram analisados, não têm peso suficiente para embasar a conclusão de que a amostra de aplicadores expostos não manifesta efeitos genotóxicos.

No presente estudo, quando frequências de aberrações cromossômicas estruturais do tipo quebras e falhas foram comparadas ao esperado casualmente em relação ao tamanho do cromossomo ou grupo cromossômico, com base nos dados de LUBS **e col.** (ISCN, 1978), verificam-se algumas diferenças: os aplicadores apresentaram frequências mais elevadas de quebras e falhas no cromossomo 2 e nos cromossomos dos grupos B e D, enquanto que os controles o fizeram nos cromossomos 1 e nos do grupo C+X. De modo inverso, nos grupos cromossômicos E, F e G+Y foram encontradas frequências mais baixas dessas anomalias. Das investigações citogenéticas em expostos a pesticidas ora discutidas, apenas VAN BAO **e col.** (1974) referiram a distribuição de quebras pelos grupos cromossômicos. Esses autores verificaram que as anomalias cromossômicas ocorriam preferencialmente nos cromossomos do grupo B, e atribuíram a fragilidade desses cromossomos provavelmente ao

comprimento do seu braço longo, em relação ao seu comprimento total. Neste caso não se têm elementos para especular sobre as causas da não casualidade observada.

Em relação às trocas entre cromátides-irmãs, elas representam a quebra das quatro cadeias de DNA das cromátides-irmãs de um cromossomo, seguida pela troca de segmentos entre elas e a fusão das cadeias em uma nova posição. As lesões cromossômicas persistentes, induzidas por exposição a agentes genotóxicos **in vivo**, facilitam a ocorrência das TCI que se manifestam em células de segundo ciclo celular. As frequências de TCI por célula, encontradas neste estudo, não diferiram significativamente entre as subamostras de aplicadores fumantes (14,13 ± 1,16) e não-fumantes (13,10 ± 1,19) e entre os controles fumantes (16,15 ± 2,15) e não-fumantes (13,11 ± 1,07). Os fumantes e não-fumantes de cada amostra foram então agrupados, e as frequências dos aplicadores (13,87 ± 0,83) não diferiram da dos controles (13,87 ± 0,96).

CID & MATOS (1983) investigaram as frequências de TCI em 22 indivíduos ocupacionalmente expostos, por pelo menos 5 anos, aos organofosforados diazinon e malation e ao organoclorado heptacloro, durante a fabricação de curtidores e branqueadores em um indústria química da Argentina, e em 20 indivíduos não-expostos. A idade média dos operários era 41,0 anos, sendo que 54% desses tinham o hábito de fumar e 36% consumiam bebidas alcoólicas. Os controles apresentaram idade média de 38,4 anos, 45% deles eram fumantes e 10% ingeriam bebidas álcoolicas. A frequência média de TCI/célula nas amostras de trabalhadores expostos foi de 7,9 ± 1,2 e na dos controles foi de 8,5 ± 1,5, não havendo diferença significativa entre elas. No

entanto, as subamostras de trabalhadores fumantes (8,4 ± 1,5) e de controles fumantes (9,1 ± 1,3) apresentaram frequências aumentadas de TCI em relação às subamostras de trabalhadores não-fumantes. LARRIPA **e col.** (1983) estudaram 20 bombeiros da Argentina acidentalmente expostos ao organofosforado dimetoato e encontraram aumento significativo das frequências de TCI (9,2 ± 0,2) em relação ao controle (8,5 ± 0,2).

Em estudos com trabalhadores rurais ocupacionalmente expostos a inseticidas também foram encontradas frequências significativamente aumentadas de TCI. Indivíduos que apresentavam sintomas de intoxicação crônica tinham frequências significativamente elevadas de TCI (6,45 ± 1,19) em relação aos assintomáticos (5,47 ± 1,03) (DULOUT **e col.**, 1985). As frequências de TCI nos 25 horticultores ocupacionalmente expostos aos organofosforados dimetoato, fenitrotion, malation e paration e aos organoclorados BHC e DDT, estudados por RUPA **e col.** (1988), variaram de 10,94 ± 0,6 a 12,58 ± 0,5, o que era significativamente maior que as dos controles não-fumantes (5,42 ± 0,5) ou fumantes (7,60 ± 0,3).

De forma similar, RUPA **e col.** (1989c) encontraram frequências aumentadas de TCI em 50 aplicadores dos inseticidas organoclorados BHC, DDT e endosulfan, dos organofosforados dimetoato, malation, fosfomidon, monocrotofós, quinolfós e paration metílico e dos piretróides cispermetrina e fenvalerato (7,85 ± 0,78 a 11,18 ± 1,32), em relação aos controles não-fumantes (4,02 ± 0,38) e fumantes (5,96 ± 0,40). O aumento de TCI apresentou correlação com a duração da exposição, que variou de 1 a 25 anos.

O efeito aditivo do consumo de cigarros, através do

significativo aumento de TCI em indivíduos fumantes quando comparados aos não-fumantes, foi verificado em várias investigações (VIJAYALAXNI & EVANS, 1982; NAGAYA & TORIUMI, 1985; HUSGAVEL-PURSIAINEN, 1987). Contudo, nos indivíduos estudados neste trabalho tal efeito não pode ser detectado, assim também como não se detectou correlação entre a frequência de TCI por célula e o consumo diário de cigarros.

As distribuições de TCI pelos cromossomos ou grupos cromossômicos ora obtidas, discordam da distribuição teórica esperada com base no tamanho relativo dos cromossomos. As frequências observadas de TCI foram maiores que as esperadas nos cromossomos dos grupos A, B e C nos aplicadores, e nos cromossomos dos pares 2 e 3 e do grupo B nos controles. As frequências observadas foram mais baixas que as esperadas nos cromossomos dos grupos E, F e G+Y, em ambas as amostras. LARRIPA **e col.** (1983) também verificaram que a distribuição de TCI entre os grupos cromossômicos, na amostra exposta ao organofosforado dimetoato, apresentou aumento significativo da frequência de TCI nos cromossomos 2 e 3 e nos grupos cromossômicos B e F, quando comparados aos controles. Porém, quando a distribuição de TCI pelos cromossomos foi comparada ao tamanho relativo desses, não foi encontrada especificidade para qualquer cromossomo

Nas amostras de aplicadores de inseticidas e de controles foi verificado, ainda, que as frequências de TCI foram maiores que as esperadas na região cromossômica mediana, concordando com os resultados obtidos por GALLOWAY & EVANS (1975) e GRANATA **e col.** (1981). Porém, neste estudo e no de GRANATA **e col.** (1981), a

frequência de TCI observada foi menor que a esperada na região distal e no de GALLOWAY & EVANS (1975) foi menor na região proximal.

Não foi encontrada correlação significativa entre as frequências de células com aberrações cromossômicas e as frequências de TCI por célula, nos indivíduos da amostra de aplicadores de inseticidas e da amostra controle, o que pode ser justificado porque esses dois parâmetros não avaliam exatamente os mesmos fenômenos, conforme já discutido anteriormente. Não se pôde detectar efeitos diferenciais das classes de inseticidas pelas comparações feitas entre grupos da amostra em estudo. Vários fatores podem ter contribuído para tal resultado, como os fatos de que alguns dos grupos eram constituídos por um número muito pequeno de indivíduos e que não havia regularidade no uso dos compostos das diferentes classes. O fator preponderante, contudo, deve ser o fato de que todos os aplicadores estavam expostos a compostos de várias classes.

O período, em anos, ao qual os aplicadores estiveram expostos profissionalmente aos inseticidas também não se correlaciona com as frequências de células com aberrações cromossômicas ou de TCI por célula. Na literatura foram referidas correlações positivas entre o tempo de exposição e as frequências de aberrações cromossômicas por PALDY **e col.** (1987) ou de TCI por célula (RUPA **e col.**, 1989c). Esses resultados podem ser decorrentes de fatores como a irregularidade na frequência com que os desinsetizadores manipularam tais compostos ao longo do tempo, ou do prolongado período (no mínimo 20 anos) ao qual eles estiveram expostos, que poderia estar associado com o desenvolvimento de eficiente mecanismo de biotransformação.

Neste caso, o melhor parâmetro a ser correlacionado com as frequências dos fenômenos citogenéticos seria o nível dos resíduos dos inseticidas no sangue. Na amostra em análise, só foram analisados os níveis séricos dos organoclorados DDT e BHC (MINELLI & RIBEIRO, comunicação pessoal) e não se encontrou correlação significativa entre quaisquer das variáveis bioquímicas e citogenéticas. Esses resultados não constituem grande surpresa, tendo em vista que a exposição nos anos mais recentes foi principalmente a inseticidas organofosforados, carbamatos e piretróides. Como não foram feitos testes para detecção desses compostos, nada se pode discutir a esse respeito.

A amostra de aplicadores de inseticidas do Serviço Regional-8 da SUCEN não apresentou frequências aumentadas de quebras e falhas cromossômicas em relação às da amostra controle, nas condições analisadas, mas manifestou efeitos genotóxicos pelas frequências alteradas de aberrações cromossômicas estruturais de certos tipos, como deficiências e rearranjos. Com base nesses resultados, sugere-se que sejam feitos exames cromossômicos nos profissionais que se iniciam no serviço e que eles sejam monitorizados subsequentemente a determinados períodos, por exemplo a cada seis meses e que o nível dos resíduos de inseticidas no sangue também seja determinado. A par disso, é primário enfatizar que o uso de dispositivos de proteção, como macacões próprios, máscaras faciais e luvas deve ser rotineiro, assim como os cuidados de higiene pessoal e a proibição aos atos de comer ou fumar durante os períodos de preparo e aplicação dos inseticidas. E na consecução desses objetivos a efetiva conscientização dos trabalhadores em

relação ao risco à saúde a que estão submetidos, sem dúvida, é mais importante do que a fiscalização, mesmo que muito eficiente.

V- RESUMO

Os pesticidas são indispensáveis na agricultura e em saúde pública devido a sua importância no melhoramento de culturas agrícolas e no controle dos vetores de doenças endêmicas, mas têm sido considerados como mutagênicos químicos potenciais. Seus efeitos genotóxicos foram verificados em sistemas microbianos e os efeitos prejudiciais nos cromossomos foram demonstrados em testes em mamíferos **in vivo** e em células de mamíferos e humanos **in vitro**. Vários estudos foram realizados em indivíduos ocupacionalmente expostos a pesticidas organoclorados, organofosforados e carbamatos, e quase todos eles demonstraram efeito clastogênico nos cromossomos. Assim, a análise de pessoas que exercem atividades relacionadas com a formulação ou utilização desses compostos é de grande importância em saúde ocupacional.

Como parte de um estudo epidemiológico multidisciplinar em servidores públicos encarregados da aplicação de inseticidas, uma investigação citogenética foi realizada em 29 homens expostos e 20 não-expostos, pareados por idade e nível sócio-econômico. Os trabalhadores expostos estiveram submetidos a BHC, DDT, clordano, cytion, deltametrina, diazinon, fenitrotion, malation, propoxur e temefós, e sua atividade incluía a manipulação desses inseticidas, 2 ou 3 dias por semana durante 20 a 33 anos. Os trabalhadores misturavam os inseticidas em baldes de metal com pás de madeira e pulverizavam com bombas manuais costais ou bombas acopladas a veículo automotor, geralmente sem qualquer medida de proteção. Dezesseis dos aplicadores e 5 indivíduos da amostra não-exposta eram fumantes e 13 dos expostos e 15 dos indivíduos não-expostos não eram

fumantes. Nenhum deles teve exposição a radiação, fez uso de drogas ou medicamentos, ou teve dieta especial por pelo menos 6 meses antes do estudo.

O estudo cromossômico foi realizado em linfócitos do sangue periférico cultivados segundo técnica clássica. O sangue venoso foi heparinizado e incubado a 37 C por 72 horas, em meio RPMI 1640 (Cultilab) com 20% de soro AB humano, e utilizou-se a fito-hemaglutinina como um agente mitogênico. A interrupção da mitose foi realizada com colquicina (0,1 ml de solução 4 X 10^{-5} M) adicionada uma hora antes da colheita de cultura, a hipotonização com KCl a 0,075 M e a fixação com metanol:ácido acético (3:1, v/v). As lâminas foram preparadas de acordo com os procedimentos padrões e coradas em solução de Giemsa a 2%. Para a identificação de trocas entre cromátides-irmãs (TCI), foram adicionados 5 µg/ml de 5-bromodesoxiuridina no início da incubação, em um grupo separado de culturas, que foi após mantido no escuro. As lâminas desse grupo foram secas ao ar, cobertas com um filme de solução de Hoechst 33258 a 10 M e expostas à luz UV, por vinte minutos. A seguir foram incubadas em NaH_2PO_4 1 M à 87-89^{0}C por 8 a 30 segundos e coradas por 5 minutos em solução de Giemsa a 2% em tampão Sorensen, pH 6,8. De cada indivíduo foram analisadas 100 metáfases para a pesquisa de aberrações cromossômicas e a incidência de trocas entre cromátides-irmãs foi avaliada em 50 metáfases. Todas as lâminas foram codificadas e as análises realizadas em teste cego.

A frequência total de células com aberrações cromossômicas não diferiu entre os aplicadores de inseticidas (3,45%) e a amostra controle (2,70%), mas as células com anomalias cromossômicas

estruturais instáveis ou estáveis foram significativamente mais frequentes nos trabalhadores expostos do que na amostra de não-expostos. Essas anomalias incluíram deficiências, inversões e translocações, bem como fragmentos acêntricos e outros rearranjos complexos. As quebras foram mais frequentes que as falhas na amostra exposta aos inseticidas mas não na amostra controle. As lesões do tipo cromossômico e cromatídico não diferiram em frequência em ambas as amostras. As regiões proximal e intermediária mostraram-se mais susceptíveis a anomalias.

Os trabalhadores expostos a inseticidas não têm número médio de TCI por célula maior do que os não-expostos. Os valores de TCI/célula variaram de 8,14 a 23,50, com uma média de 13,68 nos aplicadores de inseticidas, e de 7,38 a 23,18, com uma média de 13,87 nos controles. A análise de TCI por cromossomo ou grupo cromossômico mostrou um significativo aumento no número de trocas nos cromossomos do par 2 e dos grupos B e C+X, e um significativo decréscimo nos cromossomos dos grupos E, F e G+Y, quando os valores observados foram comparados aos esperados com base no tamanho relativo de cada cromossomo.

Não pôde ser detectado efeito aditivo do consumo de cigarros na indução de anomalias cromossômicas ou de TCI nos trabalhadores expostos a inseticidas, efeito diferencial de compostos de uma determinada classe ou correlação com o período de exposição.

Em conclusão, os aplicadores de inseticidas manifestaram frequências aumentadas de certos tipos de aberrações cromossômicas estruturais e esses resultados evidenciam que eles constituem um

grupo de risco para lesões no material genético, devendo, por isso, serem monitorizados periodicamente e orientados corretamente sobre a conveniência do uso de dispositivos e cuidados de proteção pessoal.

VI. SUMMARY

Pesticides are unavoiable in agriculture and in human health because of their importance for obtaining better crops and controlling the vectors of endemic diseases, but they have long been considered potential chemical mutagens. Their genotoxic effects have been verified in microbial systems and their injurious effects on chromosomes were demonstrated even in mammals **in vivo** and in mammalian or human cells cultivated **in vitro**. A number of studies have been done in humans occupationally exposed to chlorinated, organophosphorus and carbamate pesticides and almost all of them showed clastogenic effects on chromosomes. Thus, the examination of people engaged in the formulation or use of these compounds is of great importance in occupational health.

As part of a complex epidemiological study on public service employees who do insecticide spraying, a cytogenetic investigation has been carried out on 29 insecticide exposed and 20 non-exposed males matched by age and socioeconomic status. The exposed workers were submitted to DDT, BHC, chlordane, cythion, deltametrine, diazinon, fenitrothion, malathion, propoxur and temephos. Their work schedule comprised the handling of the insecticides, including mixing and spraying, 2 or 3 days per week during 20 to 33 years. The workers mixed the insecticides in large containers with pieces of wood and sprayed them using manual or motor-carried sprayers usually without any protective measures. Sixteen of the exposed and 5 of the non-exposed persons were smokers and 13 of the exposed as well as 15 of the non-exposed persons were non-smokers. None reported to have had radiation

exposure, medicine or drug use, or special diet for 6 months prior or during the study.

Chromosome studies were performed on peripheral blood lymphocytes cultured according to conventional techniques. Heparinized venous blood was incubated at 37^0C for 72 horas in RPMI 1640 medium (Cultilab) with 20% human AB serum, and phytohemagglutinin was used as a mitogen. Mitotic arrest was achieved with colchicine (0.1 ml of 4×10^{-5} M) added 1 hour prior to the harvest of cultures. The cells were hypotonically treated with 0,075 M KCl and fixed with methanol: acetic acid (3:1, v/v). Slides were prepared according to standard procedures and stained in 2% Giemsa.

For identification of sister chromatid exchanges (SCE), 5-bromodeoxyuridine (5 ug/ml) was added at the time of initiation to a separate culture set which was kept in the dark during incubation. The air-dried slides of this set were covered with 10 M Hoechst 33258 and exposed to UV light for 20 minutes. They were then incubated in NaH_2PO_4 1 M at 87-89^0C for 8-30 seconds and stained for 5 minutes with 2% Giemsa in Sorensen buffer, pH 6.8. For each person 100 metaphases were screened for chromosomal aberrations and the incidence of sister chromatid exchanges was screened in 50 metaphases. All the slides were coded and the analysis was blind.

The total frequency of cells with chromosomal aberrations were not increased in the insecticide sprayers (3.45%) comparing with the control sample (2.70%), but the cells with instable or estable structural chromosome anomalies were signicantly more frequent in the exposed than in the non-exposed sample. These

anomalies included deletions, inversions, and translocations, as well as acentric fragments and other complex nonidentified rearrangements. Breaks were more frequent than gaps within insecticide exposed sample but not within control sample. Chromatid and chromosome-type lesions did not differ in frequencies in the two samples. The proximal and intermediate chromosomal regions are most susceptible to anomalies.

The workers exposed to insecticides did not have a higher average number of SCE per cell than the non-exposed persons. The values of SCE/cell ranged between 8.14 and 23.50 with an average of 13.68 among the workers, and between 7.38 and 23.18 with an average of 13.87 among the controls. SCE analyses by chromosome number or group showed a significant increase in the number of exchanges in chromosomes 2, B and C+X and a significant decrease in chromosomes E, F and C+Y when the observed values were compared to the expected with basis on the length of each chromosome.

The addictive effect of smoking in evoking chromosome anomalies or SCE in insecticide exposed workers as well as differential effect of one chemical class of insecticide could not be detected. There is no correlation between cytogenetic anomalies and exposure time.

In conclusion, this study showed a higher frequency of some of types of structural chromosomal anomalies in workers than in controls. So, these workers constitute a group at risk for genetic lesions and periodical biologic monitoring must be emphasized. The correct use of personal protective measures should be also reinforced.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ADDISON, R.F. Organochlorine compounds and marine lipids. **Prog. Lipid Res., 21:** 47-71, 1982.

AL-OMAR, M.A.; TAWFIQ, S.J.; AL-OGAILY, N. Organochlorine residue levels in human milk from Baghdad. **Bull. Environ. Contam. Toxicol., 35:** 65-67, 1985.

ALY, O.A. & BADAWY, M.L. Organochlorine residues in fish from the river Nile, Egypt. **Bull. Environ. Contam. Toxicol., 33:** 246-252, 1984.

AMODIO-COCCHIERI, R. & ARNESE, A. Organochlorine pesticide residues in fish from southern Italian rivers. **Bull. Environ. Contam. Toxicol., 40:** 233-239, 1988.

ANDERSSON, O.; LINDER, C.E.; OLSSON, M.; REUTERGARDH, L.; UVEMO, U-B.; WIDEQVIST, U. Spatial differences and temporal trends of organochlorine compounds in biota from the northwestern hemisphere. **Arch. Envoron. Contam. Toxicol., 17:** 755-765, 1988.

ANSARI, G.A.S.; GORDON, P.J.; HU, L.A.; REYNOLDS, E.S. Organochlorine residues in adipose tissue of residents of the Texas gulf coast. **Bull. Environ. Contam. Toxicol, 36:** 311-316, 1986.

ARRUDA, J.A.; CRINGAN, M.S.; GILLILAND, D.; HASLOUER, S.G.; FRY, J.E.; BROXTERMAN, R.; BRUNSON, K.L. Correspondence between urban areas and the concentrations of chlordane in fish from the Kansas river. **Bull. Environ. Contam. Toxicol., 39:** 563-570, 1987.

BATISTE-ALENTORN, M.; XAMENA, N.; VELAZQUEZ, A.; CREUS, A.; MARCOS, R. Mutagenicity testing of the pyrethroid insecticide cypermethrin in **Drosophila. Mutagen., 1:** 343-346, 1986.

BATISTE-ALENTORN, M.; XAMENA, N.; VELAZQUEZ, A.; CREUS, A.; MARCOS, R. Non-mutagenicity of fenvalerate in **Drosophila. Mutagen., 2:** 7-10, 1987.

BHUNYA, S.P. & BEHERA, B.C. Evaluation of mutagenicity of a commercial organophosphate insecticide, tafethion, in mice tested in vivo. **Caryologia, 42:** 139-145, 1989.

BLEVINS, R.D.; LIJINKSY, W.; REGAN, J.D. Nitrosated methylcarbamate insecticides: effect on the DNA of human cells. **Mutat. Res., 44:** 1-7, 1977.

BRANCO, S. Efeitos do acaricida dicofol sobre alguns componentes do valor adaptativo de **Drosophila melanogaster.** Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas , Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", 1989.

BRITO FILHO, D. **Toxicologia humana e geral,** Rio de Janeiro,

Atheneu, 1985.

CAMPS, M.; PLANAS, J.; GOMEZ-CATALAN, J.; SABROSO, M.; TO-FIGUERAS, J.; CORBELLA, J. Organochlorine residues in human adipose tissue in Spain: study of an agrarian area. **Bull. Envorin. Contam. Toxicol., 42:** 195-201, 1989.

CARRANO, A.V. & NATARAJAN, A.T. Considerations for population monitoring using cytogenetic tecniques. **Mutat. Res., 204:** 379-406, 1988.

CELESTE, M.F. & CACERES, O. Resíduos de praguicidas clorados na represa do Riberão do Lobo (Broa) e nos seus rios tributários. **Ci. e Cult., 39:** 66-70, 1987.

CHATTERJEE, K.K.; TALUKDER, G.; SHARMA, A. Effects of synthetic pyrethroids on mammalian chromosomes. I. Sumicidin. **Mutat. Res., 105:** 101-106, 1982.

CHEN, H.H.; HSUEH, J.L.; SIRIANNI, S.R.; HUANG, C.C. Induction of sister-chromatid exchanges and cell cycle delay in cultured mammalian cells treated with eight organophosphorus pesticides. **Mutat. Res., 88:** 307-316, 1981.

CID, M.B.G. & MATOS, E. Intercambio de cromatidas hermanas en trabajadores de una industria quimica. **Medicina, 43:**513-516, 1983.

CID, M.G. & MATOS, E. Induction of sister-chromatid exchanges in cultured human lymphocytes by aldicarb, a carbamate pesticide. **Mutat. Res., 138:** 175-179, 1984.

CID, M.G. & MATOS, E. Chromosomal aberrations in cultured human lymphocytes treated with aldicarb, a carbamate pesticide. **Mutat. Res., 191:** 99-103, 1987.

DEAN, B.J. The effect of dichlorvos on cultured human lymphocytes. **Arch. Toxikol., 30:** 75-85, 1972.

DEAN, B.J. & BLAIR, D. Dominant lethal assay in female mice after oral dosing with dichlorvos or exposure to atmospheres containing dichlorvos. **Mutat. Res., 40:** 67-72, 1976.

DEGRAEVE, N. & MOUTSCHEN, J. Absence of genetic and cytogenetic effects in mice-treated by the organophosphorus insecticide parathion, its methil analogue, and paraoxon. **Toxicology, 32:** 177-183, 1984.

DEGRAEVE, N.; CHOULLET, M.C.; MOUTSCHEN, J. Cytogenetic and gentic effects of subchronic treatments with organophosphorus insecticides. **Arch. Toxicol., 56:** 66-67, 1984.

DEGRAEVE, N.; CHOLLET, M.C.; MOUTSCHEN, J. Mutagenic efficiency of

organophosphorus insecticides used in combined treatments. **Environ. Health Perspectives, 60:** 395-398, 1985.

DE VOS, R.H.; VAN DOKKUN, W.; OLTHOF, P.D.A.; QUIRIJNS, J.K.; MUYS, T.; VAN DER POLL, J.M. Pesticides and other chemical residues in dutch total diet samples (june 1976-july 1978). **Fd. Chem. Toxicol., 22:** 11-21, 1984.

DILLE, J.R. & SMITH, P. Central Nervous system effects of chronic exposure to organophosphate inseticides. **Aerospace Med.,** 475-478, 1964.

DULOUT, F.N.; PASTORI, M.C.; OLIVERO, O.A. Malathion-induced chromosomal aberrations in bone-marrow cells of mice: dose-response relationships. **Mutat. Res., 122:** 163-167, 1983.

DULOUT, F.N.; PASTORI, M.C.; OLIVERO, O.A.; CID, M.G.; LORIA, D.; MATOS, E.; SOBEL, N.; BUJAN, E.C.; ALBIANO, N. Sister-chromatid exchanges and chromosomal aberrations in a population exposed to pesticides. **Mutat. Res., 143:** 237-244, 1985.

DZWONKOWSKA, A. & HUBNER, H. Induction of chromosomal aberrations in the syrian hamster by insecticides tested in vivo. **Arch. Toxicol., 58:** 152-156, 1986.

EL-DIB, M.A. & BADAWY, M.I. Organochlorine inseticides and PCBs in water, sediment, and fish from the Mediterraneam sea. **Bull. Environ. Contam. Toxicol., 34:** 216-227, 1985.

ERICH, R. & GEBHART, E. The epidemiological approach: chromosome aberrations in persons exposed to chemical mutagens. In: HSU, T.C. ed. **Cytogenetic assays of Environmental Mutagens.** TOTOWA, Allanhed, Osmun, 1982. p. 385-408.

FOCARDI, S.; FOSSI, C.; LOENZIO, C.; ROMEI, R. PCB congeners, hexachlorobenzene, and organochlorine insecticides in human fat in Italy. **Bull. Environ. Contam. Toxicol., 36:** 644-650, 1986.

FRANK, R. & LOGAN, L. Pesticide and industrial chemical residues at the mouth of the Grand, Saugeen and Thames rivers, Ontario, Canada, 1981-85. **Arch. Environ. Contam. Toxicol., 17:** 741-754, 1988.

GALLOWAY, S.M. & EVANS, H.J. Sister chromatid exchanges in human chromossomes from normal individuals and patients with ataxia telangiectasia. **Cytogenet. Cell Genet., 15:** 17-29, 1975.

GEBHART, E.; WINDOLPH, B.; WOPFNER, F. Chromosomes studies on lymphocytes of patients under cytostatic therapy. **Hum. Genet., 56:** 157-167, 1980.

GRANATA, G.; CARBONE, P.; MARGIOTTA, G.; BARBATA, G.; CARONIA, F. Sister chromatid exchanges in bone marrow cells from a patient

with Franconi's anemia. **Hematológica, 66:** 18-24, 1981.

GROVER, I.S. & MALHI, P.K. Genotoxic effects of some organophosphorous pesticides. I. Induction of micronuclei in bone marrow cells in rat. **Mutat. Res., 155:** 131-134, 1985.

HANNA, W.J. & CHOO-HANG, E. Malathion poisoning: a report of 2 cases. **W.I. Med. J., 32:** 109-111, 1983.

HILMY, A.M.; BADAWI, H.K.; SHABANA, M.B. Organochlorine pesticide residues in 12 freshwater egyptian fish with special emphasis on **Aguilla vulgari** and **Mugil cephalus. Comp. Biochem. Physiol., 76C:** 163-171, 1983.

HOLT, R.L.; CRUSE, S.; GREER, E.S. Pesticide and popychlorinated biphenil residues in human adipose tissue from northeast Lousiania. **Bull. Environ. Contam. Toxicol., 36:** 651-655, 1986.

HUANG, C.C. Effect on growth but not on chromosomes of the mammalian cells after treatment with three organophosphorus insecticides (36952). **Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 142:** 36-40, 1972.

HUSGAFVEL-PURSIAINEN, K. Sister-chromatid exchange and cell proliferation in cultured lymphocytes of passively and actively smoking restaurant personnel. **Mutat. Res., 190:** 211-215, 1987.

IMAMURA, T. & TALCOTT, R.E. Mutagenic and alkylating activities of organophosphate impurities of commercial malathion. **Mutat. Res., 155:** 1-6, 1985.

IP, H.M.H. & PHILLIPS, D.J.H. Organochlorine chemicals in human breast milk in Hong Kong. **Arch. Environ. Contam. Toxico., 18:** 490-494, 1989.

ISCN (1978): An International System for human cytogenetic nomenclature. **Cytogenet. Cell Genet., 21:** 309-404, 1978.

JAGER, K.W. Aldrin, dieldrin, endrine telodrin. An epidemiological and toxicological study of long-term occupational exposure. Amsterdam Elsevier Publishing Company, 1970, 234p.

JOHNSON, A.; NORTON, D.; YAKE, B. Persistence of DDT in the Yakima river drainage, Washington. **Arch. Emviron. Contam. Toxicol., 17:** 289-297, 1988.

KANJA, L.; SKARE, J.U.; NAFSTAD, I.; MAITAI, C.K.; LOKKEN, P. Organochlorine pesticides in human milk from different areas of Kenya 1983-1985. **J. Toxicol. Environ. Health, 19:** 449-464, 1986.

KAPHALIA, B.S.; SIDDIQUI, F.S.; SETH, T.D. Contamination levels in different food items & dietary intake of organochlorine pesticide residues in India. **Indian J. Med. Res., 81:** 71-78, 1985.

KARAKAYA, A.E. & OZALP, S. Organochlorine pesticides in human adipose tissue collected in Ankara (Turkey) 1984-1985. **Bull, Environ. Contam. Toxicol., 38:** 941-945, 1987.

KARALLIEDDE, L. & SENANAYAKE, N. Organophosphorus insecticide poisoning. **Br. J. Anaesth., 63:** 736-750, 1989.

KIRALY, J.; SZENTESI, I.; RUZICSKA, M.; CZEIZE, A. Chromosome studies in workers prodicing organophosphate insecticides. **Arch. Environ. Contam. Toxicol., 8:** 309-319, 1979.

KORENBERG, J.R. & FREEDLENDER, E.F. Giemsa tecnhique for the detecttion of sister chromatid exchanges. **Chromosoma, 48:** 355-360, 1974.

KRAMERS, P.G.N. & KINAAP, G.A.C. Absence of a mutagenic effect after feeding dichlorvos to larvae of **Drosophila melanogaster. Mutat. Res., 57:** 103-105, 1978.

KRAUTHACKER, B.; KRALJ, M.; TKALCEVIC, B.; REINER, E. Levels of B-HCH, HCB, p,p- DDE, p,p'-DDT and PCBs in human milk a continental town in Croatia, Yugoslavia. **Int. Arch. Occup. Environ. Health, 58:** 69-74, 1986.

LAKKAD, B.C.; NIGAN, S.K.; KARNIK, A.B.; THAKORE, K.N.; BABU, K.A.; BHATT, K.A.; BHATT, D.K.; KASHYAP, S.K. Dominant-lethal study of technical-grade hexachlorocyclohexane in swiss mice. **Mutat. Res., 101:** 315-320, 1982.

LAL, R.; DHANARAJ, P.S.; RAO, N.V.S. Residues of organochlorine insecticides in delhi vegetables. **Bull. Environ. Contam. Toxicol., 42:** 45-49, 1989.

LARA, W.H.; BARRETTO, H.H.C.; VARELLA-GARCIA, M. Níveis de dieldrin em sangue de aplicadores de aldrin na regiaõ de São José do Rio Preto, São Paulo. **Rev. Inst. Adolfo Lutz, 41:** 9-14, 1981.

LARINI, L. Inseticidas In: _____ **Toxicologia**, São Paulo, Manole, 1987, cap.6, p.152-207.

LARINI, L. & CECCHINI, R. A intoxicação como fenômeno biológico. In: _____ **Toxicologia.** São Paulo, Manole, 1987, capl, p.1-46.

LARRIPA, I.; MATOS, E.; VINUESA, M.L.; SALUM, S.B. Sister chromatid exchanges in a human population accidentally exposed to an organophosphorus pesticide. **Rev. Brasil. Genet., 4:** 719-727, 1983.

LESSA, J.M.M.; BEÇAK, W.; RABELLO, M.N.; PEREIRA, C.A.B.; UNGARO, M.T. Cytogenetic study of DDT on human lymphocytes **in vitro. Mutat. Res., 40:** 131-138, 1976.

LITTLEFIELD, L.G. & JOINER, E.E. Analysis of chromosome aberrations

in lymphocytes of long-term heavy smokers. **Mutat. Res., 170:** 145-150, 1986.

LOMBARDI, M.; MINIUSSI, J.; MIDIO, A.F. Aspectos toxicológicos de inseticidas de uso doméstico. **Rev. Bras. Saúde Ocup., 41:** 36-48, 1983.

LOPEZ, D.; ALEIXANDRE, C.; MERCHAN, M.; CARRASCAL, E. **In vitro** induction of alterations in peripheral blood lymphocytes by different doses of diazinon. **Bull. Environ. Contam. Toxicol., 37:** 517-522, 1986.

MAJUMDAR, S.K.; KOPELMAN, H.A.; SCHNITMAN, M.J. Dieldrin-induced chromosome damage in mouse bone-marrow and WI-38 human lung cells. **J. Hered., 67:** 303-307, 1976.

MALHI, P.K. & GROVER, I.S. Genotoxic effects of some organophosphorus pesticides. II. **In vivo** chromosomal aberration bioassay in bone marrow cells in rat. **Mutat. Res., 188:** 45-51, 1987.

MATSUMURA, F. Toxicology of insecticides. New York and London, Plenum Press, 1976, 503p.

Mc DOUGALL, K.W.; AHMAD, N.; HARRIS, C.R.; HIGGINSON, F.R. Organochlorine insecticide residues in fish and birds from three river systems on the north coast region of new south wales. **Bull. Environ. Contam. Toxicol., 42:** 884-890, 1989.

MES, J.; DOYLE, J.A.; ADAMS, B.R.; DAVIES, D.J.; TURTON, D. Polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in milk and blood of canadian women during lactation. **Arch. Environ. Contam. Toxicol., 13:** 217-223, 1984.

MOORHEAD, P.S.; NOWEL, P.C.; MELLMAN, W.J.; BATIPPS, D.M.; HUNGERFORD, D.A. Chromosome preparation of leukocytes cultured from human peripheral blood. **Exp. Cell Res., 20:** 613-616, 1960.

MOUTSCHEN-DAHMEN, J.; MOUTSCHEN-DAHMEN, M.; DEGRAEVE, N. Metrifonate and dichlorvos: cytogenetic investigations. **Acta Pharmacol. et Toxicol., 49:** 29-39, 1981.

MUSSALO-RAUHAMAA, H.; PYYSALO, H.; MOILANEN, R. Influence of diet and other factors on the levels of organochlorine compounds in human adipose tissue in Finland. **J. Toxicol. Environ. Health, 13:** 689-704, 1984.

MUSSALO-RAUHAMAA, H.; ANTERVO, H.P.K. Relation between the content of organochlorine compounds in finnish human milk and caracteristics of the mothers. **J. Toxicol. Environ. Health, 25:** 1-19, 1988.

NAGAYA, T. & TORIUMI, H. Effects of smoking on spontaneous and

induced sister chromatid exchanges in lymphocytes. **Toxicol. Letters, 25:** 293-296, 1985.

NAIR, A. & PILLAI, M.K.K. Monitoring of hexachlorobenzene residues in Delhi and Faridabad, India. **Bull. Environ. Contam. Toxicol., 42:** 682-686, 1989.

NETER, J. & WASSERMAN, W. Applied linear statistical models regression, analysis of varrance, and experimental designs. In RICHARD D. IRWIN, INC. Homewood, Illinois 1977, pp. 824.

NICHOLAS, A.H.; VIENNE, M.; VAN DEN BERGHE, H. Induction of sister-chromatid exchanges in cultured human cells by an organophosphorous insecticide: malathion. **Mutat. Res., 67:** 167-172, 1979.

NOREN, K. Levels of organochlorine contaminants in human milk in relation to the dietary habits of the mothers. **Acta Poediatr. Scand., 72:** 811-816, 1983.

OBE, G.; VOGT, H.J.; MADLE, S.; FAHNING, A.; HELLER, W.D. Double-blind study on the effect of cigarette smoking on the chromosomes of human peripheral blood lymphocytes **in vivo. Mutat. Res., 92:** 309-319, 1982.

PALDY, A.; PUSKAS, N.; VINCZE, K.; HADHAZI, M. Cytogenetic studies on rural populations exposed to pesticides. **Mutat. Res., 187:** 127-132, 1987.

PARIS CONFERENCE (1971): Standartization in human cytogenetics. **Cytogenet., 11:** 313-456, 1972.

PEDNEKAR, M.D.; GANDHI, S.R. ; NETRAWALI, M.S. Evaluation of mutagenic activities of endosulfan, phosalone, malathion, and permethrin, before and after metabolic activition, in the Ames **Salmonella** test. **Bull. Environ. Contam. Toxicol., 38:** 925-933, 1987.

PEREIRA JUNIOR, A. Inseticida mata bloqueando sistema nervoso. **Folha de São Paulo,** São Paulo, 18 de junho de 1987, p.16.

RABELLO, M.N.; BEÇAK, W.; ALMEIDA, W.F.; PIGATI, P.; UNGARO, M.T.; MURATA, T.; PEREIRA, C.A.B. Cytogenetic study individuals occupationally exposed to DDT. **Mutat. Res., 28:** 449- 454, 1975.

RAMEL, C.; DRAKE, J.; SUGIMURA, T. An evaluation of the genetic toxicity of dichlorvos. **Mutat. Res., 76:** 297-309, 1980.

RANI, M.V.U.; REDDI, O.S.; REDDY, P.P. Mutagenicity studies involving aldrin, endosulfan, dimethoate, phosphamidon, carbaryl and ceresan. **Bull. Environ. Contam. Toxicol., 25:** 277-282, 1980.

RITA,P.; REDDY,P.P.; REDDY, S.V. Monitoring of workers

occupationally exposed to pesticides in grape gardens of Andhra Pradesh. **Environ. Res., 44:** 1-5, 1987.

RUPA, D.S.; RITA, P.; REDDY, P.P.; REDDI, O.S. Screening of chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges in peripheral lymphocytes of vegetable garden workers. **Human Toxicol. 7:** 333-336, 1988.

RUPA, D.S.; REDDY, P.P.; REDDI, O.S. Frequencies of chromosomal aberrations in smorkes exposed to pesticides in cotton fields. **Mutat. Res., 222:** 37-41, 1989a.

RUPA, D.S.; REDDY, P.P.; REDDI, O.S. Chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes of cotton field workers exposed to pesticides. **Emviron. Res., 49:** 1-6, 1989b.

RUPA, D.S.; REDDY, P.P.; REDDI, O.S. Analysis of sister-chromatid exchanges, cell kinetics and mitotic index in lymphocytes of smoking pesticide sprayers. **Mutat. Res., 223:** 253-258, 1989c.

SAIKI, M.K. & SCHMITT, C.J. Organochlorine chemical residues in bluegills and common carp from the irrigated San Joaquin Valley floor, California. **Arch. Environ. Contam. Toxicol., 15:** 357-366, 1986.

SAITO, I.; KAWAMURA, N.; UNO, K.; HISANAGA, N.; TAKEUCHI, Y.; IWATA, M.; GOTOH, M.; OKUTANI, H.; MATSUMOTO, T.; FUKUYA, Y.; YOSHITOMI, S.; OHNO, Y. Relationship between chlordane and its metabolites in blood of pest control operators and spraying conditions. **Int. Arch. Occup. Environ. Health., 58:** 91-97, 1986.

SALVADORI, D.M.F.; RIBEIRO, L.R.; PEREIRA, C.A.B.; BEÇAK, W. Cytogenetic effects of malathion insecticide on somatic and germ cells of mice. **Mutat. Res., 204:** 283-287, 1988.

SANT'ANA, L.S.; VASSILIEFF, I.; JOKL, L. Levels of organochlorine insecticides in milk of mothers from urban and rural areas of Botucatu, SP, Brazil. **Bull. Environ. Contam. Toxicol., 42:** 911-918, 1989.

SARKAR, A. & GUPTA, S. DDT residues in sediments from the Bay of Bengal. **Bull. Environ. Contam. Toxicol., 41:** 664-669, 1988.

SAVAGE, E.P.; KEEFE, T.J.; MOUNCE, L.M.; HEATON, R.K.; LEWIS, J.A.; BURCAR, P.J. Chronic neurological sequelae of acute organophosphate pesticide poisoning. **Arch. Environ. Health., 43:** 38-45, 1988.

SCHMITT, C.J.; ZAJICEK, J.L.; RIBICK, M.A. National pesticide monitoring program: residues of organochlorine chemicals in freshwater fish, 1980-81. **Arch. Environ. Contam. Toxicol., 14:** 225-260, 1985.

SCHULER, W.; BRUNN, H.; MANZ, D. Pesticides and polychlorinated biphenyls in fish from the Lahn river. **Bull. Environ. Contam. Toxicol., 34:** 608-616, 1985.

SENANAYAKE, N. & KARALLIEDDE, L. Neurotoxic effects of organophosphorus insecticides. **N. Engl. J. Med., 316:** 761-763, 1987.

SHIAU, S.Y.; HUFF, R.A.; WELLS, B.C.; FELKNER, I.C. Mutagenicity and DNA-damaging activity for several pesticides tested with **Bacillus subtilis** mutants. **Mutat. Res., 71:** 169-179, 1980.

SHIRASU, Y.; MORIYA, M.; KATO, K.; FURUHASHI, A.; KADA, T. Mutagenicity screening of pesticides in the microbial system. **Mutat. Res., 40:** 19-30, 1976.

SINGH, P.P. & CHAWLA, R.P. Insecticide residues in total diet samples in Punjab, India. **The science of the total Environ., 76:** 139-146, 1988.

SINHA, A.K.; LINSCOMBE, V.A.; GOLLAPUDI, B.B.; McCLINTOCK, M.L. The incidence of spontaneous cytogenetic aberrations in lymphocytes cultured form normal humans for 48 and 72 h. **Can. J. Genet. Cytol., 26:** 528-531, 1984.

SOBTI, R.C.; KRISHAN, A.; PFAFFENBERGER, C.D. Cytokinetic and cytogenetic effects of some agricultural chemicals on human lymphoid cells **in vitro:** organophosphates. **Mutat. Res., 102:** 89-102, 1982.

SOUZA, N.E.; RUBIRA, A.F.; MATSUSHITA, M.; TANAMATI, A. Resíduos de pesticidas organoclorados em amostras ambientais (águas e solos) do minicípio de Maringá-PR. **Arg. Biol. Tecnol., 31:** 587-594, 1988.

STACEY, C.I.; PERRIMAN, W.S.; WHITNEY, S. Organochlorine pesticide residue levels in human milk: Western Australia, 1979-1980. **Arch. Environ. Helath., 40:** 102-108, 1985.

STEHR-GREEN, P.A.; FARRAR, J.A.; BURSE, V.W.; ROYCE, W.G.; WOHLLEB, J.C. A survey of measured levels and dietary sources of selected organochlorine pesticide residues and metabolites in human sera from a rural population. **AJPH, 78:** 828-830, 1988.

TAGUCHI, S. & YAKUSHIJI, T. Influence of termite treatment in the home on the chlordane concentration in human milk. **Arch. Environ. Contam. Toxicol., 17:** 65-71, 1988.

TAKAMIYA, K. Residual levels of plasma oxychlordane and trans-nonachlor in pest control operators and some characteristics of these accumulations. **Bull. Environ. Contam. Toxicol., 39:** 750-755, 1987.

TAYLOR, P. Agentes antineoplásicos. In: GILMAN, A.G.; GOODMAN, L.S.; GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica.** e ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1987, p.89-106.

TOJO, Y.; WARIISHI, M.; SUZUKI, Y.; NISHIYAMA, K. Quantitation of chlordane residues in mothers milk. **Arch. Environ. Contam. Toxicol., 15:** 327-332, 1986.

TSUSHIMOTO, G.; CHANG, C.C.; TROSKO, J.E.; MATSUMURA, F. Cytotoxic, mutagenic, and cell-cell communication inhibitory properties of DDT, lindane, and chlordane on **Chinese hamster** cells **in vitro. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 12:** 721-729, 1983.

VAN BAO, T.; SZABO, I.; RUZICSKA, P.; CZEIZEL, A. Chromosome aberrations in patients suffering acute organic phosphate insecticide intoxication. **Humangenetik, 24:** 33-57, 1974.

VELAZQUEZ, A.; CREUS, A.; XAMENA, N.; MARCOS, R. Mutagenicity of the insecticide endossulfan in **Drosophila melanogaster. Mutat. Res., 136:** 115-118, 1984.

VELAZQUEZ, A.; XAMENA, N.; CREUS, A.; MARCOS, R. Indication for weak mutagenicity of the organophosphorus insecticide dimethoate in **Drosophila melanogaster. Mutat. Res., 172:** 237-243, 1986.

VELAZQUEZ, A.; CREUS, A.; XAMENA, N.; MARCOS, R. Lack of mutagenicity of the organophosphorus insecticide malathion in **Drosophila melanogaster. Environ. Mutagen., 9:** 343-348, 1987a.

VELAZQUEZ, A.; XAMENA, N.; CREUS, A.; MARCOS, R. Mutagenicity studies on fenitrothion in **Drosophila. Mutagen., 2:** 333-336, 1987b.

VIJAYALAXMI, & EVANS, H.J. **In vivo** and **in vitro** effects of cigarrette smoke on chromosomal damage and sister-chromatid exchanges in human peripheral blood lymphocytes. **Mutat. Res., 92:** 321-332, 1982.

VIOLANTE, F.S.; GENNARI, P.; RAFFI, G.B.; COLTELLI, E.; LEV, D.; MINAK, G.; TIRAFERRI, S. Study of DDT blood level in a group of workers exposed to pesticides. **Arch. Environ. Health., 141:** 117-119, 1986.

WALISZEWSKI, S.M. & SZYMCZYNSKI, G.A. Rapid and low-cost method for monitoring determination of selected chlorinated pesticides in feed mixtures. **Bull. Environ. Contam. Toxicol., 34:** 518-526, 1985.

WAN, H.; HIGGINSON, F.R.; HARRIS, C.R.; McDOUGALL, K.W. Organochlorine insecticide residues in soils used for vegetable and tropical fruit production in the cudgen- duranbah area of new south wales. **Bull. Environ. Contam. Toxicol., 42:** 177-180, 1989.

WANDERLEY, D.M.V. Malária no Estado de São Paulo, Brasil, 1980-1983. **Rev. Saúde Pública, 19:** 28-36, 1985.

WARIISHI, M.; SUZUKI, Y.; NISHIYAMA, K. Chlordane residues in normal human blood. **Bull. Environ. Contam. Toxicol., 36:** 635-643, 1986.

WARIISHI, M. & NISHIYAMA, K. Observations on the progress of chlordane contamination in humans by blood and sebum analysis. **Arch. Environ. Contam. Toxicol., 18:** 501-507, 1989.

WOODRUFF, R.C.; PHILLIPS, J.P.; IRWIN, D. Pesticide-induced complete and partial chromosome loss in screens with repair-defective females of **Drosophila melanogaster. Environ. Mutagen., 5:** 835-846, 1983.

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

ZAMBRONE, F.A.D. Perigosa família. **Ciência Hoje, 4:** 44-47, 1986.

VII. AGRADECIMENTOS

Ao término deste trabalho, agradeço a todos que de uma forma ou de outra colaboraram para a sua realização. Em especial:

À Profa. Dra. Marileila Varella Garcia, pela orientação, confiança e amizade, a qual devo minha experiência científica.

Às Profas. Dras. Dértia Villalba Freire Maia e Maria Astride Saad Corradi, pelo carinho, atenção e valiosas sugestões durante a revisão da pro-forma desta dissertação.

Aos Profes. Drs. Aluísio José Gallo e Eloíza Helena Tajara da Silva pela orientação e amizade.

Ao Prof. Antonio José Manzato, do Departamento de Análises Numérica e Estatística deste Instituto, pelo auxílio na análise estatística dos dados.

Ao Prof. Dr. James Coleman, pela revisão do Summary.

Aos professores do Departamento de Biologia pela transmissão de suas experiências e incentivo.

À Profa. Dra. Nívea Dulce Tedeschi Conforti Froes, pelo incentivo e amizade sempre presentes.

Ao Dr. Francisco Marcos Gonçalves pela colaboração no planejamento do estudo multidisciplinar e pela coordenação dos trabalhos de seleção das amostras e das coletas de sangue.

À Diretoria e aos funcionários da SUCEN e do Instituto Adolfo Lutz de São José do Rio Preto, pela ajuda na coleta dos dados.

Às Profas. Dras. Maria Lúcia Ribeiro e Elizabete Minelli, do Instituto de Química de Araraquara, UNESP, pela análise sorológica de resíduos de inseticidas das amostras estudadas.

Ao técnico e amigo Josué Rodrigues dos Santos, pela atenção e disponibilidade durante a realização da parte experimental e pela grande ajuda nos serviços fotográficos.

A pós-Graduanda Mary Massumi Itoyama, pela amizade, incentivo e disponibilidade durante a execução dos serviços de edição do texto.

Aos companheiros do laboratório de Citogenética Humana e de Vertebrados: Agnes Fett Conti, Ana Elizabete Silva, Edson Guilherme Vieira, Eliana Morielle Versute, Eny Maria Goloni Bertollo, Nilce Barril Gama e Rosa Sayoko Kawasaki Oyama.

Aos amigos do Curso de Pós-Graduação, pela amizade e convivência sempre harmoniosa.

Aos funcionários da Biblioteca, em especial a Maria Helena Dias, Maria do Carmo Junqueira e Olinda Vacari Tezini Luchezi, pela atenção constante.

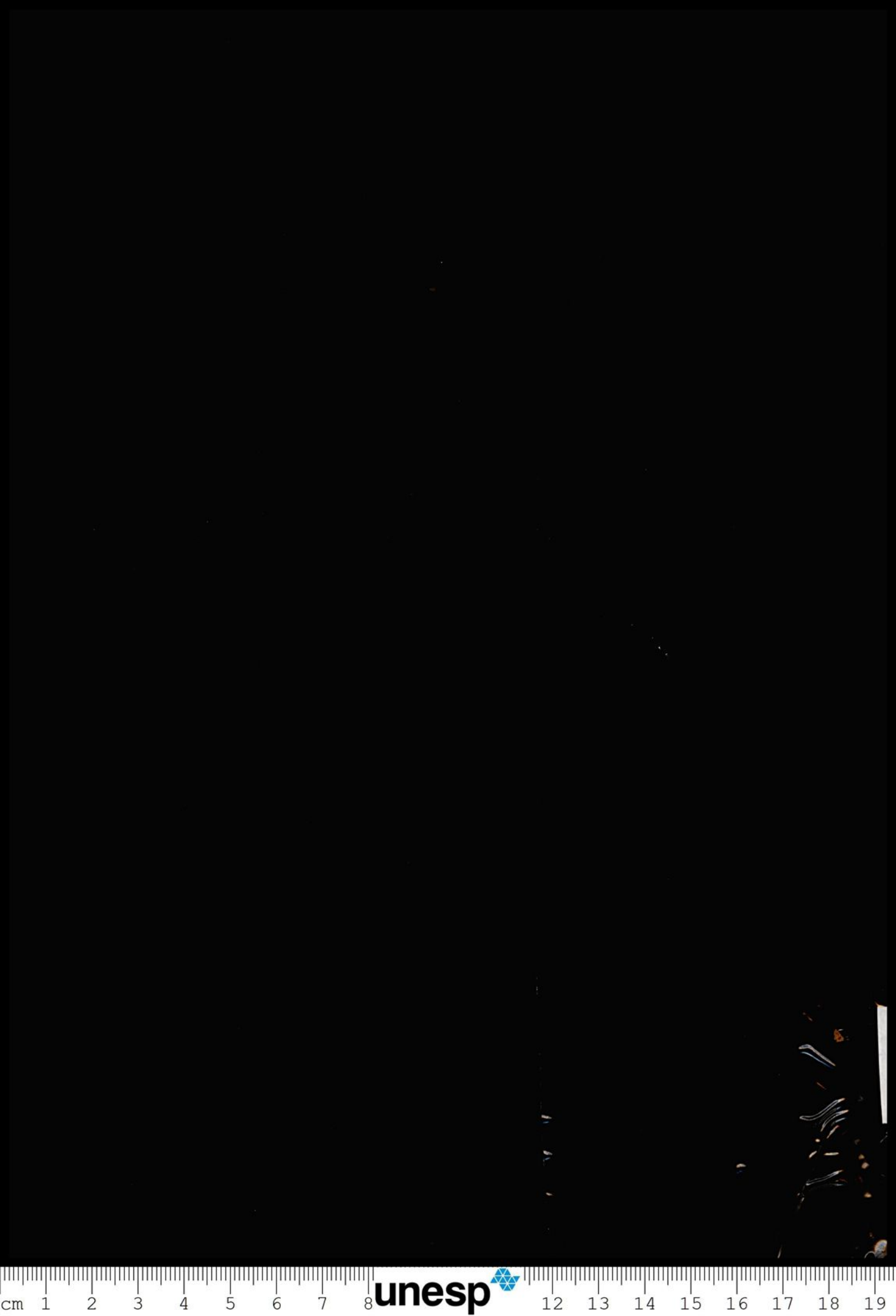
Aos funcionários Sidnei Olivio e Luiza Rosa Cirelli pela amizade e atenção quanto aos serviços no centro de microscopia.

Ao Eldes Ismael Rocha pelo serviço xerográfico.

Aos participantes das amostras, colaboradores anônimos, mas imprescendíveis para realização deste trabalho.

Ao conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio financeiro.

A Direção do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, pela disposição das condições materiais.


cm 1 2 3 4 5 6 7 8 unesp 12 13 14 15 16 17 18 19