

Mônica Vannucci Nunes

Padronização de Técnica de Extração de DNA de
Preparações Citogenéticas para Estudo do
Protoncogene NRAS em Indivíduos
Profissionalmente Expostos a Pesticidas



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

PATRONATO DE TECNICOS
DE EXTENSAO DE ENFERMAGEM
CIENTIFICAS PARA EXIBIDO DO
PROFICIONAMENTO
EM INTERMEDIOS PROFISSIONALMENTE
EXPOSICAO A FESTIVIDADES

1910000725



MÔNICA VANNUCCI NUNES

**PADRONIZAÇÃO DE TÉCNICA DE
EXTRAÇÃO DE DNA DE PREPARAÇÕES
CITOGENÉTICAS PARA ESTUDO DO
PROTONCOGENE NRAS
EM INDIVÍDUOS PROFISSIONALMENTE
EXPOSTOS A PESTICIDAS**

Tese apresentada ao Departamento de Biologia do
Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da
Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita
Filho" - UNESP, Câmpus de São José do Rio Preto,
para a obtenção do título de Doutor em Ciências
Biológicas, Área de Concentração em Genética.



725/96

São José do Rio Preto - SP
1996

AGRADECIMENTOS

Com carinho especial à Prof^a. Dr^a. Eloiza Helena Tajara da Silva, pesquisadora e orientadora exemplar, pela solidariedade, amizade e atenção com que me acolheu e guiou, realizando a análise deste trabalho com dedicação e rigor, o que permitiu a sua continuidade.

À Prof^a. Dr^a. Marileila Varella-Garcia, pela oportunidade de desenvolver meus conhecimentos na Genética Humana e Molecular.

Ao Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa, co-orientador deste trabalho, exemplo de pessoa e pesquisador, que possibilitou o desenvolvimento do projeto em seu laboratório, estando sempre presente apesar de tantas atribuições.

À Prof^a. Dr^a. Sara T. O. Saad, pessoa maravilhosa e pesquisadora admirável, que participou ativamente desse trabalho, sempre com novas idéias e incentivos, além de analisar criteriosamente a pró-forma.

Ao Prof. Dr. Igor Vassiliev, pela acolhida carinhosa de sempre, inculcando em mim a paixão pelo estudo dos pesticidas, além da valiosa contribuição a este trabalho durante o exame prévio.

Ao Prof. Dr. Edmundo José de Lucca, pelo cuidadoso exame da pró-forma e pelo exemplo de seriedade e dedicação.

Ao Prof. Dr. João Ruggiero, pela atenção e interesse na análise da pró-forma e cuja disponibilidade constante possibilitou a realização do início do presente trabalho em seu laboratório.

Aos Professores Doutores Antonio Cordeiro, pelo auxílio na análise estatística, Cláudia M. Carareto pelo apoio e disponibilidade e Bob Ami, pela colaboração e disponibilidade.

Ao Prof. Dr. Francisco Marcos Gonçalves, à Profa. Elizabete Victória Minelli, que muito colaboraram no fornecimento de informações sobre os estudos bioquímicos e clínicos dos indivíduos analisados e à Profa. Elza Midori Hashimoto, pela organização com que conservou as lâminas utilizadas no presente trabalho.

Aos funcionários da **Orientadora: Profa. Dra. Eloiza Helena Tajara da Silva** sem os quais esse estudo não teria sido possível.

A CAPES, pelo auxílio financeiro. **Co-orientador: Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa**

Aos Professores do Curso de Pós-Graduação e do Departamento de Biologia do IBILCE-UNESP, campus de São José do Rio Preto, SP, que estiveram presentes durante a minha formação acadêmica e científica.

Aos colegas do Curso de Pós Graduação, pelo convívio, amizade e pela torcida de sempre.

AGRADECIMENTOS

Com carinho especial à Prof^a. Dr^a. Eloiza Helena Tajara da Silva, pesquisadora e orientadora exemplar, pela solidariedade, amizade e atenção com que me acolheu e guiou, realizando a análise deste trabalho com dedicação e rigor, o que permitiu a sua continuidade.

À Prof^a. Dr^a. Marileila Varella-Garcia, pela oportunidade de desenvolver meus conhecimentos na Genética Humana e Molecular.

Ao Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa, co-orientador deste trabalho, exemplo de pessoa e pesquisador, que possibilitou o desenvolvimento do projeto em seu laboratório, estando sempre presente apesar de tantas atribuições.

À Prof^a. Dr^a. Sara T. O. Saad, pessoa maravilhosa e pesquisadora admirável, que participou ativamente desse trabalho, sempre com novas idéias e incentivos, além de analisar criteriosamente a pró-forma.

Ao Prof. Dr. Igor Vassilieff, pela acolhida carinhosa de sempre, incutindo em mim a paixão pelo estudo dos pesticidas, além da valiosa contribuição a este trabalho durante o exame prévio.

Ao Prof. Dr. Edmundo José de Lucca, pelo cuidadoso exame da pró-forma e pelo exemplo de seriedade e dedicação.

Ao Prof. Dr. João Ruggiero, pela atenção e interesse na análise da pro-forma e cuja disponibilidade constante possibilitou a realização do início do presente trabalho em seu laboratório.

Aos Professores Doutores Antonio Cordeiro, pelo auxílio na análise estatística, Cláudia M. Carareto pelo apoio e disponibilidade e Bob Arni, pela colaboração e disponibilidade.

Ao Prof. Dr. Francisco Marcos Gonçalves, à Profa. Elizabete Victória Minelli, que muito colaboraram no fornecimento de informações sobre os estudos bioquímicos e clínicos dos indivíduos analisados e à Profa. Elza Midori Hashimoto, pela organização com que conservou as lâminas utilizadas no presente trabalho.

Aos funcionários da SUCEN e aos demais participantes da pesquisa, sem os quais esse estudo não teria sido possível.

À CAPES, pelo auxílio financeiro.

Aos Professores do Curso de Pós-Graduação e do Departamento de Biologia do IBILCE-UNESP, câmpus de São José do Rio Preto, SP, que estiveram presentes durante a minha formação acadêmica e científica.

Aos colegas do Curso de Pós Graduação, pelo convívio, amizade e pela torcida de sempre.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular e de Hematologia do Hospital de Clínicas da UNICAMP, Mônica, Silvana, Carlos, Dil, Tereza, Marilda, Dani, entre outros, pela convivência, auxílio e ensinamentos valiosos.

Aos funcionários da Biblioteca e da Seção de Pós-Graduação do IBILCE - UNESP, pela atenção e disponibilidade constantes.

Ao Vanderley Passoni e à Lourdes Mainardi, pelo carinho nos momentos difíceis e por todo o apoio que têm me proporcionado.

Aos meus grandes amigos que, cada um a seu modo, tornaram essa jornada um pouco mais leve.

À Miriam, mãe dedicada, e à Simone, irmã querida, que mesmo longe sempre estiveram comigo.

Ao meu querido Marco, que sempre teve paciência, compreensão, respeito e amor para dar, em cada sorriso ou lágrima que esse período proporcionou.

Muito obrigada a todos!!

III. Amplificação gênica	31
IV. Detecção do fragmento amplificado	32
V. Polimorfismo de conformação de cadeia única (SSCP)	33
VI. Fixação do DNA amplificado em filtros pelo sistema dot-blot	33
VII. Hibridação com oligonucleotídeos alelo-específicos	34
VIII. Sequenciamento	36
IX. Análise estatística	37
RESULTADOS	38
I. Extração de DNA	38
II. Polimorfismo de conformação de cadeia única (SSCP)	40
III. Hibridação com oligonucleotídeos alelo-específicos	45
IV. Sequenciamento direto do fragmento amplificado	49
V. Frequência e caracterização das alterações	49
VI. Análise estatística	51
DISCUSSÃO	55
CONCLUSÕES	66
RESUMO	67
SUMMARY	68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	1
I. Detecção de marcadores moleculares do câncer	1
II. Genética do processo tumoral	4
III. Pesticidas	15
A. conceitos gerais	15
B. os organoclorados e outros pesticidas e o câncer	16
OBJETIVOS	23
MATERIAL E MÉTODOS	24
I. Caracterização da amostra	24
II. Extração de DNA de lâminas	31
III. Amplificação gênica	31
IV. Detecção do fragmento amplificado	32
V. Polimorfismo de conformação de cadeia única - SSCP	33
VI. Fixação do DNA amplificado em filtros pelo sistema dot-blot	33
VII. Hibridação com oligonucleotídeos alelo-específicos	34
VIII. Sequenciamento	36
IX. Análise estatística	37
RESULTADOS	38
I. Extração de DNA	38
II. Polimorfismo de conformação de cadeia única (SSCP)	40
III. Hibridação com oligonucleotídeos alelo-específicos	45
IV. Sequenciamento direto do fragmento amplificado	49
V. Frequência e caracterização das alterações	49
VI. Análise estatística	51
DISCUSSÃO	55
CONCLUSÕES	66
RESUMO	67
SUMMARY	68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

1. Detecção de marcadores moleculares do câncer

O entendimento dos processos envolvidos na carcinogênese teve um progresso muito rápido nas últimas décadas, principalmente graças ao desenvolvimento de técnicas que permitiram a manipulação do material genético. Entretanto, as limitações terapêuticas e diagnósticas dessa metodologia levaram, inicialmente, à concentração dos interesses na biologia da doença. As investigações eram realizadas em células tumorais cultivadas e em modelos animais, utilizando análises de DNA, RNA e proteínas. Em pouco tempo, os processos de extração de ácidos nucleicos tornaram-se de uso corrente e a amplificação de seus segmentos pela reação em cadeia da polimerase (PCR - polymerase chain reaction) permitiu o uso de amostras com uma quantidade muito pequena de material, inclusive de tumores primários. Com isso, foi possível identificar os passos genéticos envolvidos e suas consequências biológicas, além de marcadores específicos associados ao processo neoplásico, tais como vírus, mutações, alterações protéicas induzidas por essas mutações e, finalmente, outras alterações ligadas mas não diretamente relacionadas com a progressão da doença (Greer *et al.*, 1991; Sidransky, 1995). No futuro, a informação advinda desses estudos poderá, sem dúvida, ter importantes aplicações, como a avaliação dos riscos de câncer ou o seu diagnóstico precoce, o prognóstico do comportamento do tumor e do quadro clínico do paciente, e mesmo o planejamento da terapia a ser utilizada (Groopman *et al.*, 1994).

Em relação à avaliação dos riscos, têm sido intensamente investigados marcadores genéticos específicos associados com a predisposição ao câncer. Do mesmo modo, têm sido analisadas diferenças em enzimas responsáveis pelo metabolismo de carcinógenos conhecidos ou pela presença de adducts formados na interação desses carcinógenos com o DNA (Mao & Sidransky, 1994; Poulsen & Loft, 1995).

A detecção precoce da doença, por sua vez, geralmente enfoca lesões pré-neoplásicas e depende de técnicas acuradas para verificação da presença em sangue ou fluidos corporais de células anômalas ou de proteínas específicas induzidas por alterações genéticas. Conforme o câncer progride, os tecidos neoplásicos frequentemente invadem as estruturas adjacentes e podem metastatizar para nódulos linfáticos e outros locais. O conhecimento completo dos passos genéticos desse processo deve levar a considerações prognósticas importantes. Algumas mutações e produtos protéicos, por exemplo, são associados com um comportamento agressivo do tumor e podem ser usados para a escolha de uma terapia mais adequada (Greer *et al.*, 1991; Mao & Sidransky, 1994).

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

I. Detecção de marcadores moleculares do câncer

O entendimento dos processos envolvidos na carcinogênese teve um progresso muito rápido nas últimas décadas, principalmente graças ao desenvolvimento de técnicas que permitiram a manipulação do material genético. Entretanto, as limitações terapêuticas e diagnósticas dessa metodologia levaram, inicialmente, à concentração dos interesses na biologia da doença. As investigações eram realizadas em células tumorais cultivadas e em modelos animais, utilizando análises de DNA, RNA e proteínas. Em pouco tempo, os processos de extração de ácidos nucleicos tornaram-se de uso corrente e a amplificação de seus segmentos pela reação em cadeia da polimerase (PCR - **polymerase chain reaction**) permitiu o uso de amostras com uma quantidade muito pequena de material, inclusive de tumores primários. Com isso, foi possível identificar os passos genéticos envolvidos e suas conseqüências biológicas, além de marcadores específicos associados ao processo neoplásico, tais como vírus, mutações, alterações protéicas induzidas por essas mutações e, finalmente, outras alterações ligadas mas não diretamente relacionadas com a progressão da doença (Greer *et al.*, 1991; Sidransky, 1995). No futuro, a informação advinda desses estudos poderá, sem dúvida, ter importantes aplicações, como a avaliação dos riscos de câncer ou o seu diagnóstico precoce, o prognóstico do comportamento do tumor e do quadro clínico do paciente, e mesmo o planejamento da terapia a ser utilizada (Groopman *et al.*, 1994).

Em relação à avaliação dos riscos, têm sido intensamente investigados marcadores genéticos específicos associados com a predisposição ao câncer. Do mesmo modo, têm sido analisadas diferenças em enzimas responsáveis pelo metabolismo de carcinógenos conhecidos ou pela presença de **adducts** formados na interação desses carcinógenos com o DNA (Mao & Sidransky, 1994; Poulsen & Loft, 1995).

A detecção precoce da doença, por sua vez, geralmente enfoca lesões pré-neoplásicas e depende de técnicas acuradas para verificação da presença em sangue ou fluidos corporais de células anômalas ou de proteínas específicas induzidas por alterações genéticas. Conforme o câncer progride, os tecidos neoplásicos frequentemente invadem as estruturas adjacentes e podem metastatizar para nódulos linfáticos e outros locais. O conhecimento completo dos passos genéticos desse processo deve levar a considerações prognósticas importantes. Algumas mutações e produtos protéicos, por exemplo, são associados com um comportamento agressivo do tumor e, dessa forma, podem ser usados para a escolha de uma terapia mais adequada (Helzlsouer, 1994, Mao & Sidransky, 1994).

O valor de estudos nessa área depende, além da seleção do marcador, da metodologia a ser utilizada. A etapa inicial e provavelmente a mais importante é a

obtenção dos tecidos primariamente afetados. O isolamento e a preparação da amostra, seja fresca ou arquivada, é também fundamental. Espécimes frescos têm a vantagem de permitir análises prospectivas e delineamento de experimentos com controle de muitas variáveis. Ao contrário, material arquivado não apresenta essa característica mas oferece a possibilidade de estudos em amostras maiores e de frequências limitadas. As técnicas a serem empregadas também são muito importantes. Por exemplo, a análise por **Southern blot** pode ser útil em tecidos frescos mas não em espécimes parafinados. As quantidades diminutas e o pequeno tamanho das moléculas de DNA extraídas de células fixadas são, entretanto, passíveis de aplicação de PCR. Por outro lado, estudos imuno-histoquímicos podem ser valiosos em ambos os tipos de espécimes (Sidransky, 1995).

Algumas considerações mais detalhadas podem ser feitas em relação às técnicas básicas utilizadas e sua participação na confiabilidade dos resultados obtidos. Uma delas merece destaque, a da reação em cadeia da polimerase, cujo desenvolvimento data de pouco mais de dez anos (Saiki *et al.*, 1985) e cuja aplicabilidade converteu-a em um importante instrumento de estudo. Seu princípio consiste fundamentalmente na amplificação de segmentos de ácidos nucleicos de interesse, graças à atuação da enzima Taq DNA polimerase em ambiente com íons magnésio, nucleotídeos e **primers** iniciadores da reação, e graças a variações de temperatura que levam à desnaturação e à renaturação da molécula molde. Os fatores físicos e químicos que influem na PCR não são independentes entre si e envolvem desde o tipo de termociclador até as concentrações dos componentes, podendo ser modificados para produzir um aumento potencial na quantidade, especificidade ou sensibilidade da reação. Por exemplo, a concentração de cloreto de magnésio interfere na atividade enzimática, no aumento da temperatura necessária para a dissociação das cadeias de DNA e na formação de complexos solúveis desse íon com os nucleotídeos que serão reconhecidos pela polimerase (Verma & Babu, 1995).

A reação de PCR exige uma alta qualidade do DNA, cuja extração é rápida e realizada com o emprego de diversas metodologias. Alguns problemas, entretanto, são relatados pelos seus usuários. No caso de tecidos frescos, os resultados são geralmente muito bons mas alguns contaminantes presentes em altas concentrações podem inibir a reação da polimerase. É o caso do cloreto de potássio, da uréia, das porfirinas derivadas do grupo heme e de determinados metabólitos celulares (Doyle & O'Leary, 1992). A inibição envolve alteração da temperatura de anelamento dos **primers**, da atividade da enzima Taq polimerase ou mesmo do grau de desnaturação numa determinada temperatura.

Em material fixado, as dificuldades observadas são maiores. Segundo O'Leary *et al.* (1994), as possíveis causas de insucesso estão relacionadas com as metodologias utilizadas para fixação dos tecidos que, sem dúvida, alteram o estado químico e físico do DNA e do RNA. Segundo esses autores, o tipo de composto e as condições usadas

podem quebrar o DNA ou induzir ligações cruzadas entre ácidos nucleicos e proteínas, o que afeta a polimerização durante a PCR. Alguns fixadores, por outro lado, reagem com histonas e formam resíduos intercalantes, tornando inviável o uso da amostra. No caso de ligações cruzadas, a dissociação do complexo DNA-histonas pode ser atingida com o emprego de concentrações elevadas de cloreto de magnésio durante a PCR ou de extensos passos de digestão proteolítica para extração do DNA do tecido, embora esses últimos indiretamente comprometam as moléculas em virtude das sucessivas etapas de centrifugação. Quebras no DNA são certamente indesejáveis porque fornecem sítios iniciadores potenciais para a polimerase e levam assim a resultados espúrios. Os autores comentam também que se, ao contrário, a extração de ácidos nucleicos de material fixado for feita por fervura, ocorrerá grande contaminação por proteínas mas, graças à elevação da temperatura, a maioria das nucleases e proteases que interferem no processo será inativada. Greer *et al.* (1991) referem ainda que fixadores com qualidade insatisfatória ou com validade vencida, do mesmo modo que com tempo prolongado de atuação, podem afetar a amplificação de ácidos nucleicos, exigindo eficiência maior dos **primers** empregados. Em alguns casos o DNA está tão degradado que não permite mesmo a aplicação de outras técnicas.

Além da fixação, um outro fator importante que deve influenciar os resultados da PCR é a estocagem do material a ser analisado. Nesse aspecto, devem ser considerados a umidade, a temperatura, a luz e o tempo de armazenamento, além de contaminantes ambientais. Alguns relatos descrevem que o tamanho dos fragmentos de DNA obtidos por extração torna-se menor conforme passa o tempo (Greer *et al.*, 1991; O'Leary *et al.*, 1994). Não deve ser esquecido também que luminosidade e temperaturas elevadas favorecem a degradação de compostos em geral.

O efeito do oxigênio nas células vivas tem sido bastante estudado, porém pouco se sabe sobre a sua atuação em material morto ou fixado. Matsuo *et al.* (1995) observaram que o DNA em tecidos secos é degradado em um período relativamente curto de tempo na presença do oxigênio atmosférico. Tal efeito é considerado indireto e mediado por lipídios celulares, uma vez que pode ser evitado por extração prévia desses compostos. Por outro lado, a degradação dos ácidos nucleicos ocorre lentamente mesmo sem oxigênio atmosférico, sugerindo que alguns de seus doadores endógenos, como elementos metálicos oxidados e superóxidos associados a proteínas, devem interagir com o DNA e o RNA. Esses autores salientaram também que o efeito protetor da parafina e outras resinas é limitado e que outros processos de conservação devem ser considerados, tais como condições livres de oxigênio, além de remoção de fontes endógenas desse agente.

Essas observações levam a crer que as condições de processamento inicial do material a ser analisado são tão importantes quanto aquelas presentes durante a aplicação de técnicas escolhidas para uma abordagem específica. O seu conhecimento

deve ser incorporado em protocolos de estudos prospectivos do mesmo modo que para a identificação de amostras adequadas para investigação retrospectiva (Greer *et al.*, 1991). Essas últimas, pelas suas características, podem permitir análises da associação de marcadores de diferentes tipos com riscos ou comportamento de doenças neoplásicas, mesmo que isso envolva períodos muito longos de tempo. De qualquer modo, revisões sobre a metodologia e o material de estudo devem ser estabelecidas antes que sejam realizadas investigações sobre o valor de marcadores moleculares em câncer.

II. Genética do processo tumoral

O câncer é uma doença genética no nível somático, que resulta de mutações sequenciais em genes responsáveis pela proliferação e diferenciação celular (Erich, 1992). O estudo desses genes tem tido notável progresso nos últimos anos e permitiu a identificação de muitos fatores que controlam o ciclo celular. Isso propiciou não apenas um melhor entendimento de uma das mais fundamentais atividades da célula, a divisão, mas também de como alterações genéticas que afetam a proliferação celular podem contribuir para o crescimento desordenado característico do câncer (Marx, 1994).

Os dados já obtidos apontam para novos alvos de estratégias terapêuticas dessa doença como, por exemplo, moléculas cuja inibição pode levar ao bloqueio da divisão celular. Além disso, as novas informações deverão ser úteis no prognóstico da evolução dos pacientes, uma vez que existem evidências de que determinados marcadores ocorrem em estágios neoplásicos mais agressivos (Marx, 1994).

Alguns dos principais mecanismos que afetam a sequência normal de eventos do ciclo celular envolvem mutações em dois grupos principais de genes, os protooncogenes e os genes supressores de tumor. Os primeiros estão relacionados com a indução da divisão celular enquanto os outros, ao contrário, atuam sobre os primeiros, num sistema eficiente de controle de proliferação (Voet & Voet, 1995).

Mutações nos genes supressores de tumor podem contribuir para a transformação maligna das células quando a função de ambos os alelos é perdida. Alguns desses genes já foram identificados e envolvidos em várias formas mendelianas de câncer, incluindo o retinoblastoma, o tumor de Wilms, a polipose familiar de cólon, a neurofibromatose e a síndrome de Li-Fraumeni (Duisit *et al.*, 1993; Weinberg, 1995; Whartenby *et al.*, 1995). Entre eles, o gene mais comumente mutado em diferentes tipos de câncer no homem é o TP53 e esse achado tem incentivado tentativas de determinar se o mesmo é verdadeiro para tumores induzidos por carcinógenos em animais (Stanley, 1995).

Os oncogenes, ao contrário dos genes supressores, têm ação dominante e podem desencadear o processo neoplásico quando apenas um alelo sofre mutação.

Foram inicialmente descobertos em uma variedade de retrovírus indutores de tumores em animais experimentais e seu estudo mostrou serem capazes de ativar o processo de tumorigênese quando expressos em tipos celulares apropriados. Por exemplo, a transformação *in vitro* de fibroblastos de embriões de galinhas requer um dos genes de um retrovírus (o vírus do sarcoma de Rous), denominado SRC ("sark"). Esse gene, na década de setenta, foi observado ser homólogo a um gene celular normal presente não somente em aves mas também em muitos outros eucariotos, incluindo a drosófila e o homem (Erlich, 1992). A forma homóloga desse e de outros oncogenes identificados posteriormente recebeu o nome de protooncogene e seus produtos protéicos mostraram-se de fundamental importância na proliferação e na diferenciação das células, participando de rotas sinalizadoras que regulam positivamente a divisão celular (Pollack, 1995). Tais produtos podem ser classificados em quatro categorias: os fatores de crescimento, seus receptores, os transdutores de resposta a fatores de crescimento e os fatores de transcrição. Os primeiros são constituídos por polipeptídeos que participam na indução inicial do crescimento celular, diferenciação ou ambos e um dos seus exemplos mais conhecidos é o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF). A maioria desses fatores de crescimento não é capaz de atravessar a membrana celular devendo, para efetivar uma resposta, interagir com proteínas específicas de superfície denominadas receptores de fatores de crescimento, como por exemplo o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) (Voet & Voet, 1995).

As ligações entre um fator de crescimento e seu receptor resultam invariavelmente na fosforilação desses últimos e iniciam um sinal que é transmitido para o núcleo, também por meio de fosforilação protéica, através de transdutores de resposta como aqueles determinados pelos protooncogenes RAS. No núcleo, o sinal ativa certas proteínas, que ligam-se ao DNA e desempenham um papel crucial na regulação da transcrição (Smith *et al.*, 1993).

Geralmente, a ação dos produtos de protooncogenes é realizada por um de três mecanismos. Um deles, já citado, constitui a fosforilação protéica, um processo fundamental no mecanismo de transdução de sinais que é catalisado por enzimas com atividade de quinase. Muitos dos produtos de protooncogenes apresentam essa atividade e seus substratos são os aminoácidos serina, treonina e tirosina. Isso permite dividi-los em duas classes, as quinases de serina/treonina e as quinases de tirosina (Hunter, 1987). Essas últimas, por sua vez, são classificadas em três categorias. A primeira consiste de quinases que se localizam na membrana celular e são geralmente receptores de fatores de crescimento (receptores quinases de tirosina ou RTK). Aquelas localizadas no citoplasma, mas freqüentemente ligadas às membranas da célula, constituem o segundo grupo enquanto as quinases de tirosina nucleares formam o terceiro grupo (Perkins & Woude, 1993).

Um outro mecanismo pelo qual os protooncogenes exercem seus efeitos é realizado por transmissão de sinais através de ligação e hidrólise de nucleotídeos de guanina (Bourne *et al.*, 1990). Um dos principais exemplos compreende as proteínas Ras localizadas na superfície interna da membrana plasmática, que têm uma homologia considerável com outras proteínas reguladoras de ligação de nucleotídeos, as proteínas G. São essenciais ao crescimento celular normal e desempenham importante função na transmissão de sinais para o núcleo a partir dos receptores de fatores de crescimento (Bourne *et al.*, 1990; Mulcahy *et al.*, 1985).

O terceiro mecanismo pelo qual os protooncogenes regulam o crescimento e outras funções celulares é feito via controle de transcrição. Seus produtos são proteínas localizadas no núcleo, que ligam-se a sequências específicas do DNA e regulam a atividade transcricional. Esses protooncogenes são também denominados **immediate-early genes**, uma vez que seus RNA mensageiros aumentam rapidamente em quantidade quando células quiescentes são estimuladas a se dividir (Cochran *et al.*, 1983; Sukhatme *et al.*, 1988).

Os mecanismos citados são interrelacionados e envolvem um grande número de efetores e etapas complexas. Por exemplo, os fatores de crescimento ativam os receptores correspondentes, provavelmente através da indução de sua dimerização. Esse passo é seguido pela autofosforilação do receptor, ou melhor, pela fosforilação cruzada entre as moléculas do dímero formado. Tal processo ocorre em dois grupos diferentes de resíduos, inicialmente na tirosina presente no domínio quinase e, posteriormente, em tirosinas de outros sítios que servem de locais de ancoragem para diferentes moléculas transdutoras de sinais, muitas das quais são igualmente quinases (Heldin, 1995). Entre essas estão o produto do protooncogene SRC, a proteína ativadora de GTPase (GAP) e a fosfolipase C- γ . Essas proteínas citoplasmáticas contêm um ou dois módulos com 100 aminoácidos, conhecidos como domínios SH2 (**Src homology 2**), que ligam-se especificamente a tirosinas fosforiladas do receptor graças à sua conformação hemisferoidal (Voet & Voet, 1995).

Uma outra etapa complexa da sinalização intracelular envolve a ativação da proteína Ras (p21^{ras}), que é ancorada à parte interna da membrana plasmática graças a modificações do tipo farnesilação e clivagem proteolítica do terminal carboxila e posterior metilação do resíduo de cisteína exposto (Casey, 1995; Dalton *et al.*, 1995; Shack *et al.*, 1995). A ativação da p21 é realizada pelo complexo protéico GRB2/Sem 5-SOS, que mantém-se unido graças a ligações entre seus componentes via domínios SH3. O complexo, pela sua extremidade GRB2, interage com tirosinas fosforiladas do receptor de membrana através de um domínio SH2 (Basu *et al.*, 1994), promovendo a justaposição de SOS (**Son of Sevenless Protein**) e Ras. Essa interação leva à troca, no sítio do íon magnésio da p21, do difosfato de guanosina (GDP) pelo trifosfato de guanosina (GTP), posteriormente hidrolisado a GDP (Hunter, 1995). Tal atividade intrínseca de GTPase é

estimulada pela proteína GAP e pelo produto do gene da neurofibromatose tipo 1, o NF1 (Smith *et al.*, 1993). A Ras-GTP liga-se, então, ao terminal amino de uma quinase de serina-treonina da família Raf, atraindo-a para a membrana. A Raf ativada fosforila uma proteína conhecida como MEK ou MAPKK (**mitogen-activated protein kinase kinase 1**) que, por sua vez, fosforila as MAPKs ou ERKs (**extracellular-signal-regulated kinases**) em resíduos de treonina e tirosina de seqüências específicas. Uma fração delas desloca-se para o núcleo e atua na transcrição de genes de metaloproteases da matriz, VEGF/VPF (fator de crescimento endotelial vascular), CD44, MDR-1, FOS, MYC e outros genes através dos elementos de resposta do tipo AP-1/Ets, de modo a produzir os eventos determinados pelo fator de crescimento que iniciou a sinalização (Figura 1). A ação da $p21^{ras}$ também parece estar associada com a supressão de pontos de checagem do ciclo celular e com a indução de ciclina D1 e de IGF-1 (fator de crescimento semelhante à insulina), além da expressão de um grande número de proteínas por meio da ativação do fator de iniciação de tradução eIF-4E (Filmus *et al.*, 1994; Kadohama *et al.*, 1994; Sabbatini *et al.*, 1994; Dawson *et al.*, 1995; Graff *et al.*, 1995; Rak *et al.*, 1995; Voet & Voet, 1995). Parece igualmente relacionada com outros padrões de transdução de sinais que regulam a diferenciação e a morfologia da célula, por exemplo, através da reorganização do citoesqueleto (Dlugosz *et al.*, 1994; Fox *et al.*, 1994; Prendergast *et al.*, 1995).

A cascata de quinases pode ser ativada por outras vias, como por subunidades das proteínas G, já citadas. Essas moléculas constituem trímeros de uma subunidade α (PM 39000-52000) que se liga a um nucleotídeo guanina (tanto GDP quanto GTP), uma subunidade β (PM 35000-36000) e uma subunidade γ (PM 10000). As três subunidades são polipeptídeos ancorados à membrana: $G\alpha$ através de meristoilação e palmitoilação e $G\beta$ e $G\gamma$ através de prenilação (Voet & Voet, 1995). Em sua forma inativa, a proteína G é um trímero cuja subunidade α está ligada ao GDP. Quando o complexo fator de crescimento-receptor liga-se ao complexo proteína G-GDP, o GDP é substituído pelo GTP e o trímero se dissocia em um dímero $\beta\gamma$ e um complexo ativo α -GTP, estimulando ou inibindo o segundo mensageiro. O fato da subunidade α atuar como uma GTPase que hidrolisa GTP a GDP gera um mecanismo auto-regulador que inativa automaticamente a proteína G e determina a sua recombinação com o dímero $\beta\gamma$ e o retorno ao seu estado original (Rawn, 1989).

Do exposto acima, fica evidente a importância de cada uma das moléculas mensageiras, em especial das proteínas Ras, presentes no centro desse sistema sinalizador intracelular. Essas proteínas, de 21 KD (Figura 2), são codificadas por três genes (H, K e NRAS), estreitamente relacionados e membros de uma grande família de proteínas ligadoras de GTP-GDP, que estão muitas vezes alterados em linhagens celu-

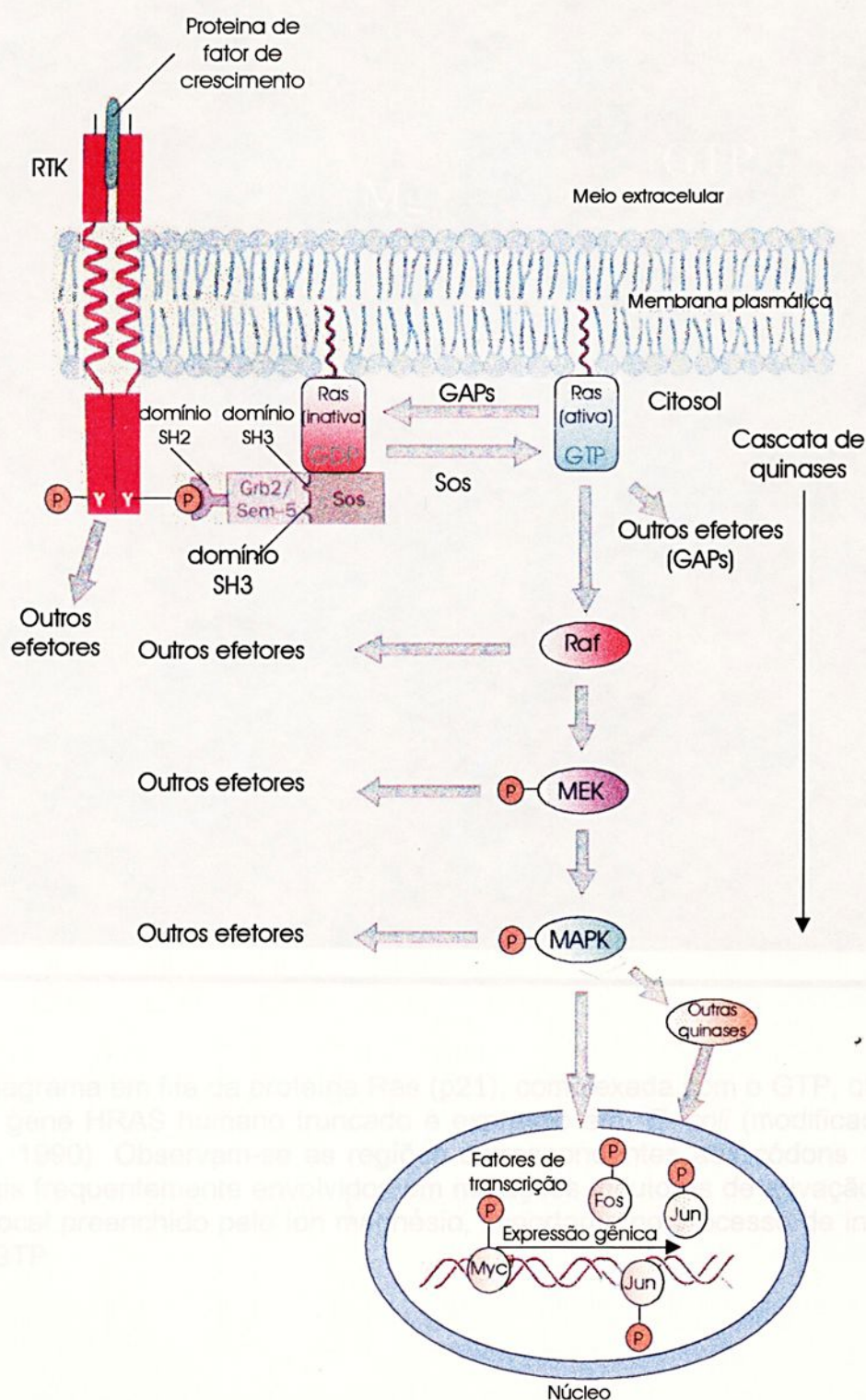


Figura 1. Cascata sinalizadora da proteína Ras (modificado de Voet & Voet, 1995).

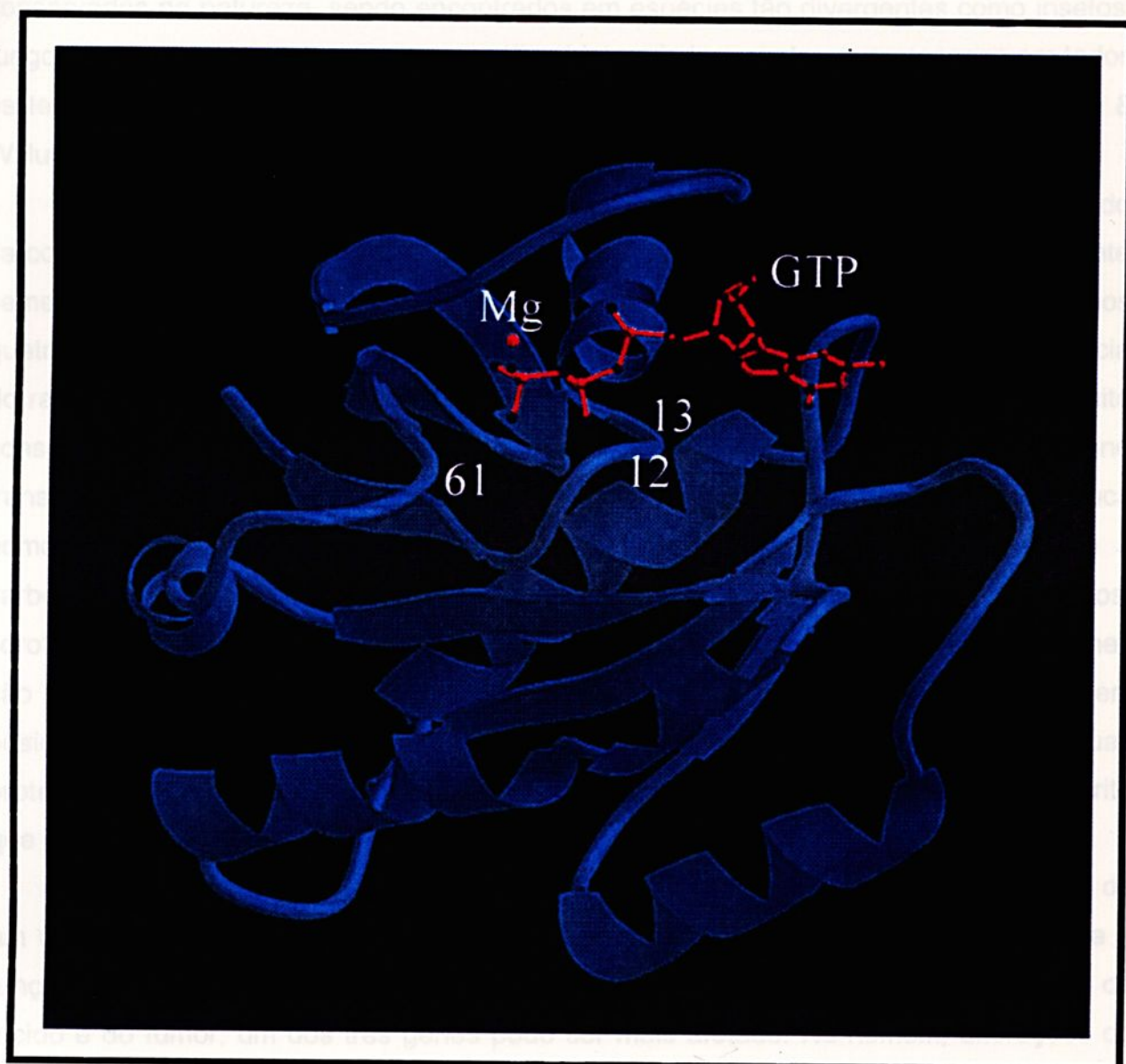


Figura 2. Diagrama em fita da proteína Ras (p21), complexada com o GTP, obtido a partir do gene HRAS humano truncado e expresso em *E. coli* (modificado de Pai *et al.*, 1990). Observam-se as regiões correspondentes aos códons 12, 13 e 61, mais frequentemente envolvidos em mutações indutoras de ativação, bem como o local preenchido pelo íon magnésio, importante no processo de interação com a GTP.

lares tumorais e em muitos tecidos neoplásicos humanos. Seus produtos são altamente conservados na natureza, sendo encontrados em espécies tão divergentes como insetos, fungos e homem. No camundongo, a análise histoquímica revelou sua presença em todos os tecidos, adultos e fetais, em especial nas células com intensa proliferação (Lowy & Willumsen, 1993).

Os genes HRAS e KRAS, originalmente isolados dos vírus Harvey e Kirsten do sarcoma de murinos, codificam proteínas de 188 ou 189 aminoácidos, sorologicamente semelhantes, que diferem somente próximo ao terminal carboxila, exceto nos últimos quatro aminoácidos envolvidos no processo pós-síntese. No caso da HRas, a sequência do rato e do homem difere em somente um aminoácido. O gene KRAS é também muito conservado, bem como o NRAS, esse último originalmente isolado como um gene transformante em uma linhagem de neuroblastoma humano. Apesar de apresentar fraca homologia às sequências dos genes K e H, especialmente na região próxima à carboxila, o NRAS especifica uma proteína de 21 KD, também com 189 aminoácidos, sorologicamente relacionada às outras duas p21. É interessante citar que os três genes são divididos em um exon não funcional e quatro exons codificadores localizados em posições idênticas, o que sugere um gene ancestral comum. O KRAS determina duas proteínas, A e B, porque tem dois exons 4 alternativos, sendo o segundo mais transcrito que o primeiro (Lowy & Willumsen, 1993).

O potencial maligno dos genes RAS tem origem em mutações que levam à troca de um único aminoácido em regiões críticas da proteína relacionadas com sua estrutura e função, em especial naquelas correspondentes aos códons 12, 13 ou 61. Dependendo do tecido e do tumor, um dos três genes pode ser mais afetado. No homem, alterações do KRAS é predominantemente observada em carcinoma de pulmão e colorretal, do NRAS em leucemias e linfomas, e do HRAS em certas neoplasias orais. O H e o NRAS também são vistos mutados em tumores de tireóide e pele (Cerutti *et al.*, 1994).

Estudos de mutação *in vitro* do HRAS têm mostrado que virtualmente qualquer substituição do aminoácido glicina na posição 12, situada no sítio de ligação do nucleotídeo, gera uma p21 transformante e sugerem que esse aminoácido é fundamental para a regulação da atividade de GTPase intrínseca da proteína. O mesmo resultado é observado em mudanças na glicina 13 e na glutamina 61, essa última aparentemente envolvida na interação com a molécula de água que reage com o fosfato γ do nucleotídeo (Saez *et al.*, 1994). As substituições nos códons 59, 63 e 117 também geram genes transformantes, e aquelas nos códons 116, 119 ou 146 estão associadas com um aumento substancial na taxa intrínseca de dissociação do complexo Ras-GDP (Lowy & Willumsen, 1993). Duplicações de códons parecem igualmente resultar em ativação da proteína e já foram relatadas por Wiest *et al.* (1994) e Higinbotham *et al.* (1994). Além das mutações estruturais citadas, outras responsáveis por amplificação gênica ou por regulação da transcrição ou tradução devem ocorrer, pois expressão elevada da proteína

tem sido verificada em certas neoplasias (Scambia *et al.*, 1993; Manges *et al.*, 1994; Wiest *et al.*, 1994). Relacionadas com esse fato, estão as referências de alelos raros na região de VNTR (**variable number of tandem repeats**) que flanqueia a extremidade 5' do gene HRAS 1 associados com risco elevado de diferentes tumores. Os mecanismos biológicos envolvidos não são conhecidos mas podem estar relacionados com a regulação da expressão gênica. É interessante que a instabilidade de pequenos segmentos repetidos (microsatélites) também foi observada mais frequentemente que o esperado nesses alelos raros de VNTR e pode refletir alterações herdadas nos genes responsáveis pelo reparo do DNA (Ryberg *et al.*, 1995).

Deve ser destacado que a perda da atividade transformante da p21 já foi observada como consequência de mutações que eliminam a região de interação com efetores secundários no terminal amina (**effector loop**) ou também na cisteína do terminal carboxila. A importância desse último resíduo na atividade da proteína decorre do fato dele se ligar ao grupo farnesil durante o processamento normal da molécula, que é necessário para sua ancoragem na superfície interna da membrana plasmática (Dalton *et al.*, 1995; White *et al.*, 1995).

Os genes RAS foram caracterizados como transformantes em potencial tanto por sua presença em certos retrovírus quanto em células NIH-3T3 transfectadas com DNA isolado de uma variedade de neoplasias. O ensaio realizado com essas células é muito laborioso e requer DNA de altíssima qualidade para análise em larga escala. Por esse motivo, os resultados obtidos nesses ensaios são interpretados com cautela, uma vez que os genes podem adquirir mutações durante o estabelecimento das linhagens celulares ou, alternativamente, a linhagem pode ser derivada de uma célula aberrante rara no tumor. Na tentativa de contornar esses problemas metodológicos, tem sido utilizada uma outra abordagem, que envolve sistemas bioquímicos e é baseada na identificação direta das mutações em ponto citadas (Erllich, 1992).

A transformação pelos genes RAS tem um efeito importante em fibroblastos. Ela resulta na diminuição da dependência de fator de crescimento, da inibição por contato e da dependência de ancoragem. Estimula a formação de tumores em camundongos **nude** e a sensibilidade à apoptose, bem como altera a morfologia celular e a atividade de proteases (Wasylyk *et al.*, 1994).

Como as alterações dos genes RAS atuam nesse processo? Já foi verificado, por exemplo, que as mutações estruturais apresentam elevação na taxa de troca GDP-GTP, redução na atividade intrínseca de GTPase ou na hidrólise do GTP pela GAP ou NF-1 (Lowy & Willumsen, 1993). É possível, então, que o complexo p21-GTP seja a forma bioquimicamente ativa da proteína mutante e leve à promoção contínua de proliferação.

Sabe-se que a introdução de genes RAS ativados em fibroblastos primários de embriões causa transformação transitória, mas não gera células malignas imortais. A

transformação neoplásica dessas células requer, além do gene RAS alterado, um segundo gene, também expresso constitutivamente, como o MYC. Sabbatini *et al.* (1994) e Giunciuglio *et al.* (1995), por exemplo, verificaram que a co-expressão elevada do HRAS e do ERBB-2, um oncogene cujo produto tem extensa homologia com o receptor do fator de crescimento epidérmico, pode induzir, em linhagens celulares de epitélio mamário humano, resistência a drogas e um fenótipo semelhante àquele presente em metástases precoces de câncer de mama. Os autores acreditam que isso ocorre porque ambos os genes aumentam a proliferação e estimulam a produção de colagenase, o que deve ser importante para a invasão da membrana basal no processo metastático. Os resultados de alguns estudos sugerem que o ERBB-2 forma heterodímeros com o receptor do fator de crescimento epidérmico e se associa com o complexo GRB2-SOS, levando à estimulação da p21 (Janes *et al.*, 1994).

Existem evidências de que a mutação do gene RAS constitui um evento precoce na progressão tumoral e, provavelmente, é causado por agentes carcinogênicos específicos (Goldfarb, 1987; Amstad & Cerutti, 1995). Tais evidências provêm de ensaios NIH-3T3, que revelam terem as células receptoras do gene transformante características pré-malignas e sugerem a necessidade de um evento adicional para a progressão neoplásica. Alguns outros dados, a partir de modelos animais, também incluem mutações nos genes RAS em neoplasias pré-malignas e, conseqüentemente, indicam sua ocorrência em estágios de iniciação da carcinogênese, por ocasião da interação direta entre o carcinógeno e o gene-alvo (Balmain & Brown, 1988). Em fases mais adiantadas do processo, pode cooperar na aquisição de características agressivas do tumor.

Kumar *et al.* (1990), através da indução de carcinomas mamários em ratos neonatos expostos ao carcinógeno nitroso-metil-uréia, verificou que a ativação do RAS pode preceder o início da neoplasia. Nessa fase, são observadas células aparentemente normais e não existem indícios de transformação maligna. Posteriormente, com a maturação sexual, a presença de estrógenos desencadeia o processo neoplásico. Uma vez que o câncer não se desenvolve imediatamente após a exposição ao agente carcinogênico, os oncogenes RAS devem permanecer latentes e exigem a cooperação de fatores adicionais para desencadear a neoplasia. Ainda em relação a esse aspecto, alguns resultados interessantes em lesões de pâncreas têm sido relatados. Por exemplo, instabilidade de microssatélites tem sido encontrada algumas vezes em altas frequências em amostras de tumores e de pancreatite. Os achados de mutações RAS nessas últimas mas não em amostras sem instabilidade levantaram a possibilidade de ocorrência de saturação do sistema de reparo decorrente da presença de radicais de oxigênio reativos. A produção desses radicais parece ser importante na patogênese da lesão benigna e poderia levar ao acúmulo de danos no DNA, incluindo inicialmente instabilidade de microssatélites e, posteriormente, eventos secundários como mutações RAS (Brentnall *et al.*, 1995).

Os termos primário e secundário devem, entretanto, ser considerados operacionais. Eles não definem na realidade quando o evento ocorre. Ao contrário, descrevem a fase em que a célula com fenótipo alterado mostra proliferação suficiente para ser revelada com as técnicas disponíveis. Assim, uma mutação precoce no processo da tumorigênese pode ser detectada apenas em estágios tardios da lesão, dependendo das vantagens seletivas adquiridas ou da metodologia de análise empregada (Cerutti *et al.*, 1994).

Embora estrutural, bioquímica e funcionalmente semelhantes, as proteínas p21^{ras} parecem ter funções distintas e consequentemente potenciais transformantes diferentes. Maher *et al.* (1995) compararam os genes humanos N, H e KRAS 2B com a mesma mutação no códon 12 (glicina → ácido aspártico) e observaram maior atividade promotora de crescimento em fibroblastos no caso do HRAS e, em células hematopoéticas, no caso do NRAS. Esses dados mostram papel biológico tecido específico para cada uma das isoformas e, de certo modo, são concordantes com os resultados referidos em doenças hematopoéticas.

Há alguns anos, por exemplo, ensaios utilizando células NIH-3T3 indicaram que entre 10 a 30% dos casos de leucemia humana e de linhagens de células leucêmicas apresentavam formas ativadas dos oncogenes NRAS e KRAS (Ahuja *et al.*, 1990). Mutações nesses oncogenes são as anomalias moleculares mais comumente detectadas na leucemia linfoblástica aguda (LLA) e na leucemia mielóide aguda (LMA), afetando aproximadamente de 20 a 30% dos casos, com predominância de ativação do NRAS. Entretanto, o papel preciso desses genes no desenvolvimento de tais doenças permanece obscuro embora alguns dados recentes sejam promissores para o seu esclarecimento (Neri *et al.*, 1988; Bashey *et al.*, 1992; Sawyers *et al.*, 1995).

Sistemas experimentais mostraram que esses oncogenes ativados não são suficientes para induzir a tumorigênese por si só em tecidos hematopoéticos, como já citado anteriormente em ensaios de transfecção gênica e em outros tecidos, requerendo eventos genéticos complementares para o desenvolvimento total do fenótipo leucêmico (Kumar *et al.*, 1990). Em ensaios com animais, foi demonstrado que sua ativação é um evento precoce, representando aparentemente a lesão inicial do carcinógeno químico (Zarbl *et al.*, 1985; Mc Mahon *et al.*, 1986; Quintanilla *et al.*, 1986). A mutação do RAS observada em síndrome mielodisplásica, que corresponde à fase de indução no desenvolvimento da neoplasia, confirma esse achado (Hirai *et al.*, 1987; Liu *et al.*, 1987). Alguns relatos esporádicos mostraram situação inversa, ou seja, que a alteração do RAS pode ocorrer como um evento tardio na progressão, após o estabelecimento do fenótipo maligno (Senn *et al.*, 1988).

Em recidivas de pacientes com LMA, Bashey *et al.* (1992) observaram que uma mutação RAS pode tanto ser perdida como ser substituída por uma mutação diferente no mesmo gene. Seus dados sobre a proporção relativa da proteína Ras mutante sugerem

que, em alguns casos de LMA, a mutação não está presente na população blástica total e é posterior a um outro evento mais precoce. Desse modo, não deve iniciar a doença, mas provavelmente contribui para o surgimento de subclones mais malignos.

É interessante lembrar que uma grande variedade de alterações moleculares ocorre durante a tumorigênese (Stanley, 1995). A sequência de ativação de oncogenes e de inativação de genes supressores de tumor deve ser um fator importante na variabilidade observada entre indivíduos diferentes bem como entre tumores de origens diversas. É evidente que tais alterações ocorrem provavelmente em virtude da ação de agentes distintos, como estresse oxidativo ou xenobióticos e constituem marcadores do processo maligno (Poulsen & Loft, 1995).

Relacionada com a sequência de eventos está a acentuada variação entre indivíduos na susceptibilidade a carcinógenos químicos, decorrente da expressão das enzimas envolvidas nos processos de transformação metabólica desses compostos e dependente, no homem, de polimorfismos genéticos (Tredaniel *et al.*, 1995). Do mesmo modo, diversos fatores determinados geneticamente parecem estar relacionados ao risco de câncer, sem uma correlação clara com qualquer carcinógeno. Um deles, por exemplo, refere-se à resposta imune a tumores que possuem proteínas mutantes características (Stauss, 1995). Fatores exógenos, como estilo de vida, também parecem ser de grande importância, uma vez que podem determinar o aporte alimentar de vitaminas antioxidantes e compostos que aparentemente modulam o risco de uma variedade de neoplasias (Riboli & Cummings, 1993).

Em relação a fatores ambientais, especialmente aqueles associados com a carcinogênese química, existem muitas evidências de sua ação sobre os genes RAS (Balmain *et al.*, 1984; Guerrero *et al.*, 1984; Zarbl *et al.*, 1985; Mc Mahon *et al.*, 1986; Quintanilla *et al.*, 1986). Todavia, outros genes também podem ser afetados, alguns deles recentemente identificados utilizando modelos de susceptibilidade tumoral em animais (Stanley, 1995). Não há dúvidas de que o estudo das mutações em situações específicas de exposição a fatores indutores de neoplasias poderá fornecer dados importantes sobre os passos iniciais da transformação maligna e indicar os riscos de populações submetidas a tais fatores.

Dos dados apresentados, fica evidente que a detecção e a estimativa da frequência de mutações em genes supressores e em oncogenes como o RAS são importantes sob vários aspectos. Elas constituem um possível marcador prognóstico ou diagnóstico, servem de auxílio na caracterização dos eventos genéticos que ocorrem no desenvolvimento de um determinado tumor e também são sinais potenciais de doença residual (van Mansfeld & Bos, 1992). Além disso, podem ser indicadores do envolvimento de carcinógenos, uma vez que esses agentes interagem com o DNA de modo a formar **adducts** específicos resultando em mutações em ponto, deficiências ou rearranjos do material genético. A identificação do **adduct** crítico, do seu significado biológico e,

conseqüentemente, do gene alvo que induz o estado transformado, trará, sem dúvida, instrumentos para o controle da prevenção e do tratamento de processos neoplásicos.

III. Pesticidas

A. conceitos gerais

O crescimento da população mundial e a demanda por alimentos têm exigido um sistema complexo de cultivo, transporte, estocagem e processamento de produtos agrícolas. Para um rendimento maior em cada uma dessas etapas, e também para o controle de vetores de diversas doenças, diferentes pesticidas têm sido empregados e, embora esses agentes sejam geralmente eficientes nestas funções, também são poluentes e podem resultar em problemas de saúde para o homem. Em termos populacionais, os efeitos mórbidos crônicos são mais prejudiciais que os agudos e existem evidências de que compreendem desde conseqüências deletérias na reprodução até sequelas neurológicas e câncer (Sharp *et al.*, 1986). Por esse motivo, vários pesticidas, como o DDT (diclorodifeniltricloroetano), HCH (hexaclorociclohexano), comercialmente conhecido como BHC, aldrin e dieldrin, tiveram seu uso restrito ou proibido na última década, principalmente em função de sua estabilidade química, efeitos sobre a vida selvagem e possível atividade carcinogênica. Tais problemas têm levado entidades governamentais de diversos países a buscar a utilização de métodos biológicos ou outros não-poluentes no combate às pragas (El-Sharkawy *et al.*, 1994).

A utilização de compostos de origem natural já é conhecida há muitos anos e foi razoavelmente bem sucedida até a década de quarenta. Esses compostos constituíram a primeira geração de pesticidas, compreendendo agentes tóxicos inorgânicos, como os arseniacais, ou de origem vegetal, como a nicotina, a rotenona e as piretrinas. Com exceção dessas últimas, os demais foram substituídos por produtos orgânicos sintéticos entre as décadas de quarenta e cinquenta. Essa segunda geração de pesticidas propiciou um excelente controle de pragas, associando ao custo reduzido a alta eficácia e a persistência no ambiente (Nunes, 1991).

Há quatro classes de defensivos agrícolas de segunda geração: os compostos organofosforados, os carbamatos, os organoclorados e os piretróides. Todos atuam sobre o sistema nervoso, sendo que as duas primeiras classes inibem a acetilcolinesterase, enquanto as demais atuam na membrana do nervo, principalmente por alteração dos mecanismos de condutância (Nunes, 1991).

A exposição do homem aos pesticidas é resultado de vários fatores durante a sua formulação, do método de aplicação e das medidas protetoras utilizadas (Carmichael, 1989). As principais vias de absorção são as vias dérmica, digestiva e respiratória. Os compostos organoclorados, por exemplo, são altamente lipossolúveis, sendo rápida e

eficazmente absorvidos pelo trato digestivo, embora esse processo ocorra em geral através da via respiratória. A absorção ocorre principalmente em indivíduos que trabalham na aplicação dessas substâncias sob a forma de pulverização ou nebulização (Hashimoto, 1990). Nos casos de intoxicação aguda, os organoclorados, devido à sua grande lipossolubilidade, agem prevalentemente no sistema nervoso, em especial na fibra nervosa e na córtex motora do SNC, levando a alterações do traçado eletroencefalográfico. Em doses elevadas, não habituais pela exposição ocupacional, são também dotados de atividade hepatotóxica e atuam provocando hepatomegalia e sucessiva necrose centro-lobular. No caso do hexaclorociclohexano, aparecem primeiramente convulsões isoladas, em alguns casos acompanhadas de cefaléia, náuseas, vômitos, vertigens e distúrbios tônico-musculares (Gonçalves, 1991).

O uso dos pesticidas cresceu muito nas últimas quatro décadas. Ao contrário de muitos produtos químicos utilizados em situações controladas e com proteção para os aplicadores, os pesticidas para uso em agricultura são destinados à distribuição ampla no ambiente. O uso global da pulverização acarreta uma significativa exposição em potencial para milhões de pessoas e uma exposição menos intensa para centenas de milhões. Entretanto, estimativas seguras do risco de carcinogênese da maioria dos pesticidas comercialmente importantes é ainda muito limitada. As informações disponíveis de estudos com animais em laboratório são escassas, do mesmo modo que os dados de estudos epidemiológicos em seres humanos. Segundo Vineis *et al.* (1995), de uma lista de 53 pesticidas, avaliados pelos grupos do IARC (**International Agency for Research on Cancer**) entre 1972 e 1994, a informação considerada suficiente ou limitada sobre a carcinogenicidade no homem estava disponível para apenas quatro compostos (arseniacaís, clorofenóis, fenoxiácidos e cloreto de vinil).

Em face das evidências mínimas sobre o risco de câncer associado a compostos específicos, é instrutivo investigar grupos ocupacionalmente expostos, incluindo indivíduos que trabalham na manufatura e na aplicação de pesticidas e agricultores.

B. Os organoclorados e outros pesticidas e câncer

Os compostos organoclorados, entre eles o DDT, encontram-se presentes em quase todos os ambientes e armazenam-se em plantas e em tecidos animais. As restrições ao seu uso foram produto da grande capacidade residual e da possível ação carcinogênica desses compostos, aos quais todos os organismos estão expostos, seja pela água, ar ou alimentos. Uma vez que as vias de absorção são variadas e eficazes, relações entre causa e efeito são difíceis de ser estabelecidas, pois sinais clínicos podem surgir após longo período de tempo, tornando improvável a detecção do agente causal.

Um quadro específico devido a intoxicação crônica por organoclorados é uma questão controvertida na literatura médica. Alguns autores referem não haver observado sintomas de doença em grupos ocupacionalmente expostos. Em contrapartida, há os que encontram, com certa frequência, alterações da função hepática, hiperalfalipoproteinemia e, em particular, sintomas neurológicos e psíquicos menores. Entretanto, discute-se se esses sintomas não representariam episódios agudos da exposição ocupacional a esses compostos (Gonçalves, 1991).

Como os organoclorados são os compostos mais persistentes no ambiente dentre os pesticidas, podem representar maior perigo à saúde humana e sua ação no organismo estar entre os fatores etiológicos de doenças importantes como o câncer. O grupo compreende hidrocarbonetos intensamente utilizados na agricultura, que se caracterizam por conter em sua estrutura um ou mais anéis aromáticos ou cíclicos saturados. Sua ação no ambiente é controlada por três de suas propriedades, ou seja, lipossolubilidade, apreciável pressão de vapor em temperatura ambiente e grande estabilidade, o que os torna geralmente resistentes à degradação biótica ou abiótica. Incluem produtos como o clordano, o heptacloro, o endrin e o DDD (2,2 bis p-clorofenil 1,1-dicloroetano), além do DDT e seu derivado DDE (2,2, bis p-clorofenil 1,1-dicloroetileno), HCH, aldrin e dieldrin, já citados, e de seus isômeros (Larini, 1979).

O HCH, por exemplo, admite a possibilidade de dois tipos de isomeria: em anel, na qual podem modificar-se as conformações em relação ao plano da molécula; e de substituição, onde cada átomo de cloro pode estar ligado ao anel na posição equatorial ou axial, resultando em uma série enorme de isômeros. Os principais são conhecidos por α , β , γ , δ e ϵ , sendo o γ (lindano) aquele com maior potencial inseticida mas menor capacidade de acúmulo nos tecidos. Segundo Larini (1979), esse isômero, que é a principal fração do produto comercializado, apresenta uma configuração espacial com todos os átomos de cloro nas posições equatoriais, o que resulta numa conformação mais estável, provavelmente responsável por sua maior potência de ação. Quanto ao DDT, os isômeros principais são pp'-DDT (único com ação inseticida), op'-DDT e oo'-DDT.

Diferentes autores (Yoder *et al.*, 1973; Crossen *et al.*, 1978; Pednekar *et al.*, 1987; Páldy *et al.*, 1987) têm relacionado alguns compostos organoclorados como "prováveis carcinógenos na espécie humana" e sua ação indutora de tumores tem sido demonstrada em estudos com animais (Chadwick *et al.*, 1985). Em particular, o DDT exibe atividade neoplásica significativa em fígado, tecido linfático e pulmões de roedores, enquanto o dieldrin apresenta dados menos significativos quanto a essa atividade (Sharp *et al.*, 1986).

Na espécie humana, as evidências quanto ao potencial carcinogênico dos organoclorados são insuficientes. Entretanto, limitações dos estudos realizados bem como dados consistentes em animais indicam que tais agentes podem realmente levar ao desenvolvimento de neoplasias no homem. Além disso, sua persistência no ambiente e o

uso contínuo em países do Terceiro Mundo, como no caso do DDT, reforçam a necessidade de novas investigações. De qualquer modo, é importante salientar que os organoclorados não são os únicos pesticidas suspeitos de envolvimento na indução de neoplasias. Outros como os fenoxiherbicidas, os resíduos de dioxina e os compostos arseniacais já foram analisados e também parecem elevar os riscos de câncer (Sharp *et al.*, 1986).

→ Os possíveis mecanismos envolvidos no processo de malignização pelos agrotóxicos são inúmeros e podem atingir direta ou indiretamente o material genético. Telang *et al.* (1982), por exemplo, estudando o efeito epigenético dos pesticidas organoclorados, especificamente o clordane e o heptacloro, verificaram que esses, do mesmo modo que já havia sido observado para o DDT, inibem a comunicação intercelular entre hepatócitos de rato em cultura, uma propriedade de muitos agentes promotores de tumor. Como os compostos organoclorados são lipofílicos e, por isso, tendem a se acumular na parte lipídica da membrana celular, é possível que sua presença interfira diretamente nas **gap-junctions** e, portanto, na comunicação intercelular. Esse fato poderia determinar a perda de transmissão de fatores reguladores de divisão e diferenciação e, conseqüentemente, da restrição ao crescimento imposta por células normais sobre células iniciadas, levando a uma proliferação desordenada dessas últimas.

Um outro mecanismo pelo qual os defensivos agrícolas e inseticidas poderiam agir na malignização envolve danos diretos ao material genético. Diferentes estudos sobre a ação de pesticidas organoclorados têm revelado frequência elevada de aberrações cromossômicas, mas não de trocas entre cromátides-irmãs, em indivíduos ocupacionalmente expostos a tais compostos (Yoder *et al.*, 1973; Rabello *et al.*, 1975; Crossen *et al.*, 1978; Dulout *et al.*, 1985; Kashyap, 1986; Saito *et al.*, 1986; Páldy *et al.*, 1987; Rita *et al.*, 1987; Rupa *et al.*, 1988; Rupa *et al.*, 1989; Hashimoto, 1990; Lipkowitz *et al.*, 1992; Carbonell *et al.*, 1993). Por exemplo, Hashimoto (1990), como parte de um estudo epidemiológico em trabalhadores encarregados da aplicação de pesticidas para combate a endemias, realizou uma investigação citogenética em 20 indivíduos controles e em 29 indivíduos expostos a diversos compostos por períodos superiores a 20 anos. Seus resultados mostraram que a frequência de células com aberrações cromossômicas estruturais instáveis ou estáveis foram significativamente mais frequentes no grupo exposto.

Em nível molecular, Chuang & Chuang (1991), estudando culturas de células de sangue periférico provenientes de um indivíduo com leucemia mieloblástica, verificaram que a inibição da proliferação celular e da indução da diferenciação pelo organoclorado heptacloro é acompanhada por um decréscimo na expressão aparente do gene NRAS, medida pela quantidade total de RNAm sintetizada. As conseqüências de tal decréscimo causado pelo heptacloro, seja por supressão na taxa de transcrição ou por degradação de RNAm, não são conhecidas. De qualquer modo, esse achado é interessante, dado que o

gene NRAS faz parte de uma família de protooncogenes que estão envolvidos no desenvolvimento e progressão de diferentes tipos de neoplasias (van Mansfeld & Bos, 1992).

Do ponto de vista epidemiológico, a avaliação do potencial carcinogênico dos pesticidas é extremamente complexa. As dificuldades são inúmeras em face da heterogeneidade dos compostos utilizados, da variabilidade nos métodos de aplicação e da ausência de dados adequados sobre a natureza da exposição (Brouwer *et al.*, 1994).

Segundo Viel e Richardson (1991), as estimativas do risco de exposição a pesticidas ou a outros agentes tóxicos fazem uso de diferentes abordagens. São utilizados, por exemplo, dados como o tipo e a duração das atividades agropecuárias, obtidos por questionários ou entrevistas com o indivíduo ou com seus familiares. Contudo, erros inerentes a essa abordagem são inevitáveis. Também são empregadas matrizes estatísticas que atribuem uma certa probabilidade de exposição a compostos químicos ou físicos a uma determinada profissão e fornecem estimativas qualitativas dessa exposição. As medidas do nível dos pesticidas no ambiente são igualmente usadas, pois permitem detectar picos de exposição, apesar de serem influenciadas pelas condições climáticas. Outra abordagem consiste na análise de amostras de tecidos de pessoas expostas e na monitorização biológica, que inclui medidas de compostos originais, de seus metabólitos ou de um marcador de resposta como a acetilcolinesterase. Essas análises, contudo, exigem metodologias complexas e de alto custo e são, sem dúvida, impraticáveis para um grande número de indivíduos.

Fica evidente, portanto, que o nível preciso de exposição a pesticidas é difícil de ser obtido e por isso, na maioria das vezes, são empregadas medidas subjetivas como, por exemplo, tempo de exposição, área geográfica ou frequência de uso (Brouwer *et al.*, 1994). Com isso, os resultados utilizados para investigar a relação entre pesticidas e câncer muitas vezes não esclarecem se são realmente esses e não outros agentes que estão associados ao aumento na incidência dessa doença. De qualquer modo, tanto as abordagens indiretas como as diretas, utilizando, respectivamente, indivíduos expostos ocupacionalmente através de atividades agrícolas ou desinsetizadores e trabalhadores com conhecida exposição a esses produtos, raramente permitem correlacionar os efeitos clínicos com compostos específicos (Sharp *et al.*, 1986; Brouwer *et al.*, 1994). Além disso, a análise é dificultada pelo longo período necessário para a indução do câncer e pelos problemas na obtenção de dados precisos sobre exposições anteriores a substâncias tóxicas (Johnson *et al.*, 1993).

Apesar dessas dificuldades, Sharp *et al.* (1986) acreditam que características comuns entre os diferentes estudos realizados levam à credibilidade das inferências a partir dos dados, que podem ser seguidas com abordagens epidemiológicas e experimentais mais diretas. Na revisão feita por esses autores, os estudos consultados, estratificados por idade de óbito, demonstraram índices significativamente maiores de

leucemia, mieloma múltiplo e linfoma em indivíduos que trabalham no campo e revelaram associações significativas entre altos níveis de exposição a criadouros de aves domésticas ou a pesticidas e essas neoplasias. Essa consistência de resultados sugeriu a ocorrência de interação entre diferentes agentes, tais como substâncias químicas e certos vírus envolvidos na etiologia de leucemias e linfomas no homem e em animais.

Outros autores também têm conseguido relacionar determinados tipos de exposição ocupacional a neoplasias hematológicas. Por exemplo, atividades ligadas à agricultura, ao processamento de alimentos e à exposição a solventes orgânicos, frequentemente utilizados na aplicação de pesticidas, têm sido associadas a mieloma múltiplo, linfomas de Hodgkin e não-Hodgkin (La Vecchia *et al.*, 1989; Godon *et al.*, 1991).

Situações mais específicas, como exposição ao benzeno e outros derivados de petróleo, têm sido relacionadas a mielodisplasia (Mansoor *et al.*, 1993; Farrow *et al.*, 1989) e anemia aplástica (Jacobs *et al.*, 1993; Lorand *et al.*, 1984) e exposição ao DDT a leucemia linfóide crônica (Flodin *et al.*, 1988). Alterações pré-leucêmicas (Goldberg *et al.*, 1990), leucemias agudas (Janicki, 1972; Sandler & Collman, 1987; Brown *et al.*, 1990; Chuang & Chuang, 1991; Crane & Keating, 1991; Cuneo *et al.*, 1992; Fagioli *et al.*, 1992; Richardson *et al.*, 1992), leucemias diversas (Godon *et al.*, 1989) e câncer do tecido linfático (Godon *et al.*, 1991) também têm sido ligados ao uso de pesticidas em geral.

Um estudo interessante da associação leucemias-pesticidas, que demonstra bem a problemática envolvida em investigações epidemiológicas, foi descrito por Mulder *et al.* (1994). Na Holanda, durante o cultivo de bulbos florais, que são muito susceptíveis a doenças, a aplicação de diferentes agrotóxicos é realizada intensamente (em média, 120 Kg de ingrediente ativo/hectare/ano) durante os vários estágios de crescimento da planta. Os autores, estudando a região de Aalsmeer, que constitui um dos maiores centros mundiais do cultivo de flores, próxima ao principal aeroporto do país, verificaram um aumento de mais de quatro vezes na incidência de tumores hematopoéticos em adultos jovens no período de 1980 a 1985, em relação a outros locais. A análise das águas de uma lagoa natural, utilizada para banho, em uma área de recreação nas proximidades do aeroporto, revelou contaminação por pesticidas, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e benzeno em níveis acima dos limites aceitáveis. As amostras de sedimentos da lagoa apresentaram, por exemplo, concentrações de DDT e endrin vinte vezes superiores às de lagoas de outros locais. Embora não tenha sido possível descartar efeitos de outros fatores ambientais, uma colinearidade evidente entre exposição a defensivos agrícolas, recreação na lagoa e neoplasias foi observada. Os autores salientaram que muito pouco é conhecido sobre o período de latência de neoplasias malignas do sistema hematopoético e, desse modo, não foi possível determinar o período de exposição relevante em nível individual. Não há razão para assumir, entretanto, que a exposição foi sistematicamente medida diferencialmente para o grupo controle e para o grupo exposto.



Ao contrário, os dados podem, na verdade, ter resultado em uma subestimação dos riscos.

Um outro estudo sobre o mesmo problema foi realizado por Brown *et al.* (1990) em um grupo constituído por 578 homens com leucemia e 1245 indivíduos controles, residentes em Iowa e Minnesota (EUA). Os dados mostraram uma pequena, mas significativa, elevação no risco de vários tipos de leucemia entre indivíduos relacionados a atividades agropecuárias em comparação a outros com diferentes atividades. Não foram encontradas associações com pesticidas específicos mas com um grupo de pesticidas de uso veterinário, incluindo os organofosforados crotoxfós, diclorvós e famphur; as piretrinas; os organoclorados metoxicloro e DDT e a nicotina. Viel & Richardson (1991), em estudo desenvolvido no sul da Normandia, região da França que exhibe fortes contrastes de atividades agropecuárias, também verificaram um aumento estatisticamente significativo na mortalidade por leucemia entre indivíduos do sexo masculino com idade superior a 15 anos e expostos a pesticidas, em áreas de cultivo de cereais.

Em uma investigação posterior, Viel & Richardson (1993) chamaram a atenção para o fato de que nenhum fator agrícola isolado foi consistentemente associado com neoplasias. Além disso, sugeriram que também devem ser consideradas outras substâncias utilizadas por agricultores como, por exemplo, o benzeno ou o cloranfenicol (de estrutura semelhante à dos clorofenóis), que podem estar relacionados a processos indutores de leucemia.

Buckley *et al.* (1989), num estudo sobre exposição ocupacional de pais de crianças com leucemia aguda não linfoblástica, verificaram uma associação positiva entre o risco de desenvolvimento de leucemia na progênie e exposição a pesticidas. Este estudo é interessante porque indica que, no risco do potencial carcinogênico, deve ser considerada não apenas a possibilidade de mutações genéticas somáticas, mas também de alterações em células germinativas.

Embora as neoplasias hematopoéticas sejam aparentemente as mais comuns entre os agricultores estudados, diferentes tumores sólidos têm sido referidos com o uso de pesticidas. No caso especial dos organoclorados, entretanto, algumas investigações têm falhado em revelar ligação com sarcomas, câncer de cólon e de pulmão, apesar de sugerirem o envolvimento do DDT em hipertensão, doença vascular cerebral e aterosclerose (Wang & MacMahon, 1979 *a,b*). Outros estudos, ao contrário, encontraram altas taxas de mortalidade para esses tipos de câncer em diversos grupos ocupacionalmente expostos. Por exemplo, a revisão feita por Sharp *et al.* (1986) mostra uma frequência significativamente alta de câncer de pulmão, independente do hábito de fumar ou não, em um grupo de trabalhadores agrícolas que utilizaram pesticidas entre 1948 e 1972 na Alemanha. Ditraglia *et al.* (1981), estudando indivíduos empregados em quatro indústrias de organoclorados nos EUA, referiram mortes por pneumonia e "outras doenças respiratórias" acima do número esperado entre aqueles que trabalhavam na

manufatura de aldrin, dieldrin e endrin. Observaram, igualmente, um número maior de mortes causadas por câncer em outros locais do organismo que não o pulmão, como estômago, esôfago, reto, fígado e sistemas linfático e hematopoético e, por isso, recomendaram o acompanhamento dos padrões de mortalidade desse grupo durante vários anos. Resultados semelhantes foram encontrados por Blair *et al.* (1983), que relataram um aumento significativo na mortalidade por câncer de pulmão, de cérebro e leucemia, particularmente leucemia mielóide aguda, em um grupo de aplicadores de pesticidas na Flórida, com uma possível relação entre o período de exposição e o desenvolvimento da doença.

Nos EUA, o clordane e o heptacloro foram comumente utilizados em formulações para propósitos agrícolas e para erradicação de cupins domésticos. Infante *et al.* (1978) relataram cinco casos de neuroblastoma em crianças associados a exposição por clordane durante o período pré e pós-natal. Três casos de anemia aplástica e três casos de leucemia aguda foram também ligados à exposição a esse composto.

Dos dados apresentados, parece evidente que o potencial carcinogênico dos pesticidas, embora difícil de ser investigado, merece uma avaliação cuidadosa. A genotoxicidade está entre os mais sérios dos possíveis danos causados por esses produtos e sua importância é decorrente principalmente da natureza irreversível do processo e do fato de estarem envolvidos na etiologia de uma doença grave como o câncer que tem longo período de latência antes da sua completa manifestação.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

A SUCEN (Superintendência do Controle de Endemias), responsável pelo combate às endemias como a malária no Estado de São Paulo, vem mantendo um programa constante de vigilância epidemiológica para evitar possíveis focos endêmicos de doenças. Em decorrência da situação nacional, o Estado de São Paulo está em constante risco de reintrodução de endemias, pelo intenso fluxo migratório presente (Hashimoto, 1990; Gonçalves, 1991). Entre os recursos utilizados para impedir que isso ocorra, está o uso de inseticidas de ação residual, como os organoclorados. Dessa modo, uma equipe permanente de trabalhadores treinados é mantida sob exposição regular a tais compostos, constituindo uma população com características de exposição a longo prazo a diversos inseticidas.

Alvo de estudo multidisciplinar realizado no período de 1987 a 1991 envolvendo pesquisadores de várias instituições, alguns voluntários do sexo masculino, 29 dos quais foram expostos por vários anos a esse serviço, bem como 20 indivíduos não expostos participaram de uma monitorização extensa sobre as consequências dessa exposição crônica duradoura. Além de estudos bioquímicos e clínicos realizados, a amostra foi utilizada para uma investigação citogenética em culturas de linfócitos de sangue periférico (Hashimoto, 1990). As lâminas obtidas foram codificadas e arquivadas no Laboratório de Citogenética do IBILCE-UNESP, a temperatura ambiente, por cerca de cinco anos.

As evidências do potencial carcinogênico dos pesticidas, a frequência aumentada de leucemias em indivíduos expostos a e a ativação de certos genes nesse tipo de exposição, a necessidade de investigar a etiologia dos cânceres e a possibilidade de cânceres de origem ambiental, tornaram o material citogenético arquivado atraente para a investigação de cânceres. Para a realização desse estudo, era necessário o desenvolvimento de uma técnica que permitisse a utilização do material disponível para análise molecular. Sendo assim, foi proposto o seguinte trabalho, que teve como objetivos:

1. Otimizar uma metodologia que permitisse a utilização de DNA proveniente de lâminas arquivadas de preparações citogenéticas em procedimentos de análise molecular.
2. Investigar a presença de mutações no protooncogene NRAS em indivíduos continuamente expostos a pesticidas e em indivíduos controles, para avaliação de seu potencial como biomarcador de exposição a esses compostos.

OBJETIVOS

3. Discutir possíveis efeitos dos pesticidas e de outros fatores como agentes

OBJETIVOS

A SUCEN (Superintendência do Controle de Endemias), responsável pelo combate de endemias como a malária no Estado de São Paulo, vem mantendo um programa constante de vigilância epidemiológica para evitar possíveis focos autóctones de doenças. Em decorrência da situação nacional, o Estado de São Paulo está em constante risco de reintrodução de endemias, pelo intenso fluxo migratório presente (Hashimoto, 1990; Gonçalves, 1991). Entre os recursos utilizados para impedir que isso ocorra, está o uso de inseticidas de ação residual, como os organoclorados. Desse modo, uma equipe permanente de trabalhadores treinados é mantida sob exposição regular a tais compostos, constituindo uma população com características de exposição a longo prazo a diversos inseticidas.

Alvo de estudo multidisciplinar realizado no período de 1987 a 1991 envolvendo pesquisadores de várias instituições, alguns voluntários do sexo masculino, 29 dos quais expostos por vários anos a esse serviço, bem como 20 indivíduos não expostos, participaram de uma monitorização extensa sobre as consequências dessa exposição crônica duradoura. Além de estudos bioquímicos e clínicos realizados, a amostra foi utilizada para uma investigação citogenética em culturas de linfócitos de sangue periférico (Hashimoto, 1990). As lâminas obtidas foram codificadas e arquivadas no Laboratório de Citogenética do IBILCE-UNESP, à temperatura ambiente, por cerca de cinco anos.

As evidências do potencial carcinogênico dos pesticidas, a frequência aumentada de leucemias em indivíduos expostos e a ativação de certos genes nesse tipo de neoplasia tornaram o material citogenético arquivado atraente para a investigação de riscos de câncer. Para a realização desse estudo, era necessário o desenvolvimento de uma técnica que permitisse a utilização do material disponível para análise molecular. Sendo assim, foi proposto o seguinte trabalho, que teve como objetivos:

1. Otimizar uma metodologia que permitisse a utilização de DNA proveniente de lâminas arquivadas de preparações citogenéticas em procedimentos de análise molecular.
2. Investigar a presença de mutações no protooncogene NRAS em indivíduos cronicamente expostos a pesticidas e em indivíduos controles, para avaliação de seu potencial como biomarcador de exposição a esses compostos.
3. Discutir possíveis efeitos dos pesticidas e de outros fatores como agentes mutagênicos e carcinogênicos.

MATERIAL E MÉTODOS

I. Caracterização da amostra

No presente trabalho, foi extraído e analisado DNA de material arquivado em lâminas, obtido após cultura de linfócitos de sangue periférico de indivíduos expostos e não expostos ocupacionalmente a pesticidas. Esse material fez parte da amostra estudada citogeneticamente por Hashimoto (1990).

O grupo exposto foi constituído por 28 trabalhadores desinsetizadores, componentes das equipes de operação de campo da SUCEN, Serviço Regional 8, de São José do Rio Preto, SP. O serviço é subdividido em quatro setores de Laboratório e Operação de Campo nos municípios de São José do Rio Preto, Catanduva, Votuporanga e Jales. Todos os indivíduos, selecionados entre aqueles com maior tempo de exposição aos pesticidas DDT e BHC, participaram total ou parcialmente das campanhas para erradicação da malária e do combate à doença de Chagas. A idade nesse grupo variou de 46 a 63 anos (média de 52,5 e desvio-padrão de $\pm 4,12$ anos) enquanto o tempo de exposição ocupacional aos inseticidas variou de 20 a 33 anos (média de 24,4 anos e desvio padrão de $\pm 2,94$ anos).

Dezesseis aplicadores eram fumantes, sendo seis fumantes leves, com consumo de 1 a 5 cigarros por dia. Três deles 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 doze aplicadores não eram fumantes.

Cinco desses participantes encontravam-se, na época da colheita de sangue, exercendo as funções internas na SUCEN de atendente de equipe de profilaxia, encarregado de setor de transporte, vigia de depósito de veneno, almoxarife ou auxiliar de laboratório. No entanto, foram mantidos na amostra por continuarem em contato com os pesticidas, praticamente no mesmo nível em que o faziam quando eram desinsetizadores.

Os compostos manipulados foram os organoclorados BHC, DDT e clordane, os organofosforados cythion, diazinon, fenitrothion, malation e temefós, o carbamato propoxur e o piretróide deltametrina (Tabela 1).

A manipulação desses compostos teve início em 1959, com a aplicação diária do composto DDT, seguida do BHC em 1965. A partir de 1968, o BHC e o 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 oito horas por dia, até a sua extinção completa a partir de 1989. Os demais compostos começaram a ser aplicados a partir de 1980: propoxur em 1980, clordane em 1982, temefós e diazinon em 1984 e cythion, fenitrothion e malathion em 1985, e foram empregados no programa de erradicação dos vetores de febre amarela e dengue com frequência de uma vez por semana e média de quatro horas por dia. Em 1988, foi introduzida a deltametrina no

combate ao vetor da doença de Chagas em substituição aos organoclorados e as aplicações foram feitas por cerca de oito horas por dia, uma ou duas vezes por semana.

Durante os vários anos de exposição ocupacional aos inseticidas, nunca foram fornecidos ou usados quaisquer equipamentos de proteção individual, exceto capacete.

As informações referentes a idade, tabagismo, período de exposição em anos, discriminação dos compostos manipulados e dados citogenéticos para cada um dos indivíduos estudados do grupo exposto são apresentadas na Tabela 2.

Os níveis de pesticidas organoclorados detectados por análise cromatográfica no plasma dos indivíduos pertencentes ao grupo exposto são dispostos na Tabela 3.

O grupo controle foi constituído por 20 funcionários de instituições públicas de São José do Rio Preto, SP. Todos negaram a exposição ocupacional a inseticidas, embora alguns referissem o uso esporádico de pesticidas com formulação à base de piretróides e organofosforados. A faixa etária variou entre 37 e 64 anos (média de 49,0 anos e desvio padrão de $\pm 8,82$ anos). Quanto ao hábito de fumar, cinco eram fumantes intensos de longa data, com uso de cerca de 20 cigarros com filtro por dia, e 15 eram não fumantes, todos pareados com os indivíduos expostos quanto ao sexo e ao nível sócio-econômico. Os participantes não manifestavam doenças crônicas, não referiram o uso constante de medicamentos e a ingestão de bebidas alcoólicas ou de dietas alimentares especiais.

As informações referentes a idade, tabagismo, atividade profissional, hábito de fumar e dados citogenéticos de cada um dos indivíduos estudados do grupo controle são apresentadas na Tabela 4. Os níveis de pesticidas organoclorados detectados por análise cromatográfica no plasma dos indivíduos pertencentes ao grupo controle encontram-se dispostos na Tabela 5.

O estudo cromossômico, realizado por Hashimoto (1990), foi desenvolvido em linfócitos de sangue periférico cultivados segundo técnica clássica, resumidamente descrita a seguir. O sangue venoso foi heparinizado e incubado a 37°C por 72 horas, em meio RPMI 1640 com fitohemaglutinina (0,36 mg/ml) e 20% de soro AB humano. A interrupção da divisão celular foi feita com colquicina (concentração final de 0,02µg/ml), adicionada uma hora antes da colheita de cultura, seguida de hipotonização com KCl 0,075M e de fixação com metanol:ácido acético (3:1). As lâminas foram preparadas de acordo com procedimento padrão e coradas em solução de Giemsa 2%. Em todos os casos, foram montadas réplicas, algumas para identificação de trocas entre cromátides irmãs (TCI), que receberam 5-bromodesoxiuridina no início do cultivo.

Todas as lâminas foram codificadas e, após seleção e análise ao microscópio com uso de óleo de imersão, foram arquivadas em caixas à temperatura ambiente, onde permaneceram por um período aproximado de cinco anos até serem submetidas à técnica de extração de DNA. A codificação utilizada para as lâminas, feita em teste cego, foi mantida durante todos os experimentos realizados pelo presente trabalho e só foi desvendada após a obtenção de seus resultados.

Tabela 2. Caracterização da amostra de indivíduos expostos. AF = aplicadores fumantes; ANF = aplicadores não fumantes.

Tabela 1. Compostos manipulados pelos aplicadores de pesticidas da SUCEN.

Indivíduo	Idade	Compostos manipulados**	Outras denominações	logE-citocromos P-450	Extrínsecas	Númericas
		cigarros/dia (anos)				
AF1	52	28	1,2,3,5,6,7,8,9,10	5	6	4
AF2	52	28	1,2,3,5,6,7,8,9,10	5	6	1
AF3	52	28	1,2,3,5,6,7,8,9,10	5	6	6
AF4	52	28	1,2,3,5,6,7,8,9,10	5	6	6
AF5*	55	27	1,2,4,5,6,7,8,9,10	4	4	4
AF6	51	25	1,2,3,5,6,7,8,9,10	2	2	2
AF7*	49	24	1,2,3,5,6,7,8,9,10	6	6	6
AF8*	52	24	1,2,3,5,6,7,8,9,10	4	5	5
AF9	59	33	1,2,7,8,9,10	1	1	1
AF10	49	28	1,2,3,5,6,7,8,9,10	2	3	3
AF11*	52	29	1,2,4,5,6,7,10	3	3	3
AF12	49	29	1,2,7,10	3	3	3
AF13	50	24	1,2,7,8,9,10	3	3	3
AF14	50	21	1,2,7,8,9,10	3	3	3
AF15	54	26	1,2,7,8,9,10	1	1	1
AF16	49	28	1,2,3,5,6,7,8,9,10	7	7	7
ANF1	48	28	1,2,3,5,6,7,8,9,10	2	2	2
ANF2*	51	20	1,2,3,5,6,7,8,9,10	0	0	0
ANF3	53	29	1,2,3,5,6,7,8,9,10	5	6	6
ANF4	54	27	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10	5	5	5
ANF5	51	26	1,2,4,5,6,7,8,9,10	2	2	2
ANF6	50	28	1,2,3,5,6,7,8,9,10	9	9	9
ANF7	50	30	1,2,7,8,9,10	4	4	4
ANF8	53	30	1,2,3,5,6,7,8,9,10	1	1	1
ANF9	54	29	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10	7	7	7
ANF10	48	27	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10	2	2	2
ANF11	54	29	1,2,3,6,7,8,9,10	1	1	1
ANF12	54	33	1,2,8,9,10	1	2	2
			Decis			
			K-Obiol			
			K-Otrine			

* na época da coleta não se encontravam mais no mercado, portanto não foram utilizados; embora continuassem expostos ocupacionalmente a pesticidas.

** Organoclorados: 1-BHC, 2-DDT, 3-Dieldrina.

Organofosforados: 4-Cyfluthrin, 5-Diazinon, 6-Dicofano, 7-Zedano, 8-Malathion.

Carbamatos: 9-Propoxur, 10-Temefós.

Piretróides: 3-Deltametrina.

*** alterações citogenéticas observadas por Hashimoto (1990).

Tabela 2. Caracterização da amostra de indivíduos expostos. AF = aplicadores fumantes; ANF = aplicadores não fumantes.

Indivíduo	Idade	Consumo cigarros/dia	Exposição (anos)	Compostos manipulados**	Alterações citoge- néticas/100 células	
					Estruturais	Numéricas
AF1	53	20	28	1,2,3,5,6,7,8,9,10	3	4
AF2	52	01	30	1,2,3,5,6,7,8,9,10	1	1
AF3	46	20	27	1,2,4,7,8,9,10	5	6
AF4	49	30	30	1,2,3,5,6,7,8,9,10	6	6
AF5*	55	01	27	1,2,4,5,6,7,8,9,10	3	4
AF6	51	20	25	1,2,3,6,9,10	2	2
AF7*	49	30	24	1,2	6	6
AF8*	52	05	24	1,2,9	4	5
AF9	59	90	33	1,2,7,8,9,10	1	1
AF10	49	20	28	1,2,9	2	3
AF11*	52	20	29	1,2,4,5,6,7,10	3	3
AF12	49	03	29	1,2,7,10	3	3
AF13	50	05	24	1,2,7,8,9,10	3	3
AF14	50	20	21	1,2,7,8,9,10	3	3
AF15	54	20	26	1,2,7,8,9,10	1	1
AF16	49	05	28	1,2,8,9,10	7	7
ANF1	48		28	1,2,3,5,6,7,8,9	2	2
ANF2*	51		20	1,2,10	0	0
ANF3	53		28	1,2,5,7,9	5	6
ANF4	54		27	1,2,3,4,5,6,8,9,10	5	5
ANF5	61		26	1,2,4,6,7,8,9,10	2	2
ANF6	50		28	1,2,7,8,9,10	9	9
ANF7	60		30	1,2,7,8,9,10	4	4
ANF8	63		30	1,2,7,10	1	1
ANF9	54		29	1,2,3,4,6,7,8,9,10	7	7
ANF10	48		27	1,2,9	2	2
ANF11	54		29	1,2,3,6,7,8,9,10	1	1
ANF12	56		33	1,2,8,9,10	1	2

* na época da colheita do sangue, não se encontravam exercendo função de desinsetizadores, embora continuassem expostos ocupacionalmente a pesticidas.

** **Organoclorados:** 1:BHC; 2:DDT; 3:Clordane.

Organofosforados: 4: Cytion; 6: Diazinon; 7: Fenitrothion; 8: Malation.

Carbamato: 9: Propoxur; 10: Temefós.

Piretróide: 5: Deltametrina.

*** alterações citogenéticas observadas por Hashimoto (1990)

Tabela 3. Níveis de pesticidas organoclorados detectados por análise cromatográfica no plasma dos indivíduos pertencentes ao grupo exposto. (NA = não analisado; ND = não detectado; TR = traços)(Minelli, 1993)

Indivíduo	Concentração de pesticidas (ppb ou µg/l)								
	α-HCH	γ-HCH	β-HCH	HCH total	p,p'DDE	o,p'DDT	p,p'DDD	p,p'DDT	DDT total
AF1	0,6	TR	27,1	27,7	35,4	1,9	ND	10,8	48,1
AF2	0,9	TR	129,0	129,9	24,2	1,9	TR	15,0	41,1
AF3	TR	TR	32,9	32,9	54,5	ND	TR	4,4	58,9
AF4*	0,6	TR	6,3	6,9	26,2	1,0	ND	8,2	35,4
AF5	0,3	TR	17,1	17,4	72,1	1,3	TR	15,4	88,8
AF6	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
AF7*	0,6	0,3	13,3	14,2	45,5	ND	ND	1,6	47,1
AF8	0,6	0,6	14,6	15,8	56,4	ND	ND	3,3	59,7
AF9*	0,3	TR	75,7	76,0	48,2	TR	TR	5,2	53,4
AF10	0,7	TR	43,9	44,6	106,0	4,4	TR	23,7	134,1
AF11	0,4	ND	3,4	3,8	14,7	ND	TR	1,9	16,6
AF12	0,4	TR	13,1	13,5	57,7	ND	ND	4,9	62,6
AF13*	0,5	TR	12,7	13,2	33,0	ND	ND	5,5	38,5
AF14	0,4	TR	58,2	58,6	405,9	4,7	TR	62,9	473,5
AF15*	0,3	TR	114,8	115,1	40,9	2,5	TR	19,6	63,0
AF16*	0,2	TR	12,3	12,5	11,5	TR	TR	2,5	14,0
ANF1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
ANF2	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
ANF3*	TR	TR	48,6	48,6	62,5	2,4	ND	23,2	88,1
ANF4	0,4	TR	19,6	20,0	74,7	0,7	ND	5,8	81,2
ANF5*	TR	ND	23,2	23,2	47,2	1,2	ND	16,8	64,4
ANF6	0,5	0,5	11,8	12,8	39,2	TR	ND	7,7	46,9
ANF7	0,9	0,7	30,5	32,1	157,0	2,1	ND	21,5	180,6
ANF8**	0,4	TR	40,3	40,7	41,3	1,3	ND	10,8	53,4
ANF9	0,3	TR	27,2	27,5	55,6	ND	ND	8,8	64,4
ANF10	TR	TR	15,3	15,3	31,6	TR	TR	5,0	36,6
ANF11	0,8	TR	20,8	21,6	99,0	1,4	TR	13,2	113,6
ANF12*	0,3	0,2	7,0	7,5	5,9	ND	TR	1,6	7,5

* presença de alterações no gene NRAS.

Tabela 5. Níveis de pesticidas organoclorados detectados por análise cromatográfica no plasma dos indivíduos pertencentes ao grupo controle (NA = não analisado; ND = não detectado; TR = traços)(Minelli, 1993)

Tabela 4. Caracterização da amostra controle. CF: fumantes; CNF: não fumantes.

Indivíduo	Idade	Consumo cigarros/dia	Exposição (anos)	Profissão	Alterações citoge- néticas/100 células	
					Estruturais	Numéricas
CF1	38	20	18	Auxiliar de planejamento	3	3
CF2	38	20	14	Agente de saneamento	3	3
CF3	51	20	11	Garagista	3	3
CF4	40	20	15	Motorista	4	4
CF5	42	20	13	Pedreiro	5	5
CNF1	63		23	Agente de saneamento	2	2
CNF2	53		19	Motorista	1	1
CNF3	61		29	Escriturário	1	3
CNF4	52		18	Auxiliar de laboratório	4	4
CNF5	54		30	Atendente de enfermagem	0	1
CNF6	54		25	Motorista	2	2
CNF7	64		35	Servente de limpeza	0	0
CNF8	55		24	Motorista	2	4
CNF9	49		18	Técnico de aparelhos de precisão	7	7
CNF10	43		6	Servente de pedreiro	2	2
CNF11	37		6	Almoxarife	5	5
CNF12	41		18	Atendente de enfermagem	1	3
CNF13	47		5	Oficial de manutenção	2	2
CNF14	40		16	Agente de saneamento	1	1
CNF15	59		25	Oficial de manutenção	1	1

* presença de alterações no gene NRAS.

Tabela 5. Níveis de pesticidas organoclorados detectados por análise cromatográfica no plasma dos indivíduos pertencentes ao grupo controle. (NA = não analisado; ND = não detectado; TR = traços)(Minelli, 1993)

II. Extração de DNA de lâminas

Para extração de DNA das lâminas, foram adaptadas metodologias citadas pela literatura para essa finalidade (Jonveaux, 1991; Melo *et al.*, 1992).

Em geral, foram utilizadas três lâminas, colocadas em suporte aluminizado encaixado em placas de Petri, que receberam 180µl de tampão de extração (NaCl 100mM; Tris-HCl 50 mM, pH 7,5; EDTA 1mM, SDS 1% e 20µl de proteinase K 10 mg/ml) e foram incubadas em estufa por 55°C por 30 minutos. O tampão foi, então, retirado com o auxílio de uma micropipeta, depositando-se o líquido em um tubo tipo **ependorf** de 2 ml. As lâminas receberam mais 200µl de tampão de extração com 20µl de proteinase K 10 mg/ml e foram, a seguir, raspadas com uma lâmina de bisturi nº11 estéril, sendo o tampão recolhido e adicionado ao anterior. O tubo permaneceu em banho-maria a 37°C **overnight**. Após esse período, foi submetido a centrifugação a 12 000 rpm por 20 minutos e teve retirado o sobrenadante, que sofreu duas extrações, por fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e por clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). Recebeu, então, uma solução de etanol absoluto e acetato de sódio 300 mM gelada, sendo o frasco agitado delicadamente e mantido **overnight** a -20°C. Em seguida, foi submetido a centrifugação por 20 minutos a 12 000 rpm e à retirada do sobrenadante e foi mantido aberto à temperatura ambiente até que estivesse totalmente seco. O DNA precipitado no tubo foi então ressuspenso em água desionizada, estando pronto para os procedimentos de amplificação.

Foram testados diferentes tempos de atuação da proteinase K, de 30 minutos a 24 horas, concentrações de SDS de 0,1µg a 1µg no tampão de extração, além do uso de lavagem da lâmina com tampão de extração após a exposição ao tampão na estufa e de raspagem da lâmina após essa lavagem.

III. Amplificação gênica

A reação em cadeia da polimerase seguiu o método descrito por Saiki *et al.* (1995, 1988), com modificações.

Os fragmentos do gene NRAS amplificado têm aproximadamente 118 pb, tanto para o códon 61 quanto para os códons 12 e 13. Os dois pares de **primers** utilizados, provenientes da **Research Genetics** e da **Clontech** (Palo Alto, CA, EUA), mostram a seguinte composição de bases:

NRAS/códons 12, 13

5' ATGACTGAGTACAAACGTGT

3' CTCTATGGTGGGATCATATT

NRAS/códon 61

5' CAAGTGGTTATAGATGGTGA

3' AGGAAGCCTTCGCCTGTCCT

A mistura de reação consistiu de um volume total de 50µl, contendo em média 1µl da amostra, solução tampão para a enzima Taq polimerase (KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 8,3, MgCl₂ 1,5 mM, gelatina 0,01%), 100 pM de cada primer, 200µM da mistura de nucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) e água desionizada autoclavada. O volume da amostra foi escolhido após numerosos testes com volumes variáveis, dependendo principalmente da quantidade de DNA dissolvido no extrato. As reações em cadeia da polimerase foram efetuadas em aparelho ciclador de temperatura (**Perkin Elmer/Cetus**, Norwalk, Conn, EUA). Inicialmente, as amostras foram aquecidas a 94°C por 6 minutos, para inativação de qualquer atividade de proteases que pudessem interferir na reação enzimática. Posteriormente, 2,5 unidades de Taq polimerase foram adicionadas à mistura. Ao volume final foram acrescentados 20µl de óleo mineral, para impedir a evaporação.

As condições de reação consistiram de 40 ciclos de variações de temperatura. Cada ciclo foi composto das fases de desnaturação a 94°C por 90 segundos, anelamento a 55°C por 90 segundos e extensão a 72°C por 120 segundos. No último ciclo, levou-se a efeito um período de extensão mais longo, de 7 minutos.

IV. Detecção do fragmento amplificado

Para confirmação do sucesso da amplificação, foram confeccionados géis de agarose 3%. O gel foi preparado em 100ml de tampão TBE (Tris 0,089M, Borato 0,089M, EDTA 0,01M, pH 7,5) e 0,5µl de brometo de etídio 8mg/ml. Após eletroforese a 100V por aproximadamente 50 minutos, o gel foi colocado sobre um transiluminador UV e fotografado pelo sistema **Polaroid**.

As amostras amplificadas para os códons 12 e 13 foram submetidas a metodologia de rastreamento de mutações diversa das amostras amplificadas para o códon 61. Para as primeiras, foi utilizado o sistema para detecção de polimorfismo de conformação de cadeia simples (SSCP) **Fast-System (Pharmacia)**, enquanto para o códon 61, após fixação do DNA em filtros de nylon pela técnica de **dot-blot**, foi utilizado o sistema de hibridação com oligonucleotídeos alelo-específicos.



V. Polimorfismo de conformação de cadeia única (SSCP - *Single Strand Conformation Polymorphism*)

O rastreamento de mutações das amostras pelo método de polimorfismo de conformação de cadeia única foi realizado, em alguns casos, conforme técnica originalmente descrita por Orita *et al.* (1989), ou seja, com fragmentos marcados radioativamente, para estabelecimento do padrão de bandas. Entretanto, em virtude da maior facilidade, da rapidez e da equivalência de resultados, a análise das amostras dos códons 12 e 13 por polimorfismo de conformação de cadeia única foi realizada pelo método não radioativo, utilizando a coloração por nitrato de prata (método **Fast System, Pharmacia**).

Para detecção de mutações em ponto nos códons 12 e 13, as amostras amplificadas de DNA foram diluídas em uma solução contendo formamida 95%, EDTA 10mM pH 8,0 e azul de bromofenol 0,1%. A seguir, foram submetidas a desnaturação por 5 minutos a 95°C e então aplicadas em minigel homogêneo de poliácridamida 20% (**Pharmacia**). A eletroforese transcorreu em potência constante (0,5W) e temperatura de 15°C, sendo a amostra aplicada quando a voltagem atingiu 100V. A corrida foi mantida até que o corante indicativo ultrapassasse o nível do gel de agarose, ou seja, cerca de 45 minutos após o início da eletroforese (a 212 aVh). Em todos os experimentos, foram aplicadas amostras de DNA controles provenientes de linfócitos de indivíduos normais.

Coloração por nitrato de prata

Após a eletroforese, os minigéis foram transferidos para o compartimento do aparelho **Fast System (Pharmacia)** e submetidos à fixação por ácido tricloroacético 20% por 5 minutos e glutaraldeído por mais 5 minutos. A seguir, foram realizadas duas lavagens consecutivas com água desionizada por 2 minutos cada uma, previamente ao contato com a solução de nitrato de prata 0,4%, que teve tempo de ação de 8 minutos. Seguiram-se mais duas lavagens com água desionizada, de 30 segundos cada, e a revelação da coloração por solução de Na_2CO_3 2,5% e formaldeído 0,013%. A seguir, os géis foram fixados por ácido acético 5% por 2 minutos e, finalmente, submetidos a um banho de glicerol 13%.

VI. Fixação do DNA amplificado em filtros de nylon pelo sistema *dot-blot*.

Foram utilizados cerca de 20µl de DNA amplificado para cada amostra, acrescidos de 140µl de solução desnaturante (NaOH 0,4N e EDTA 25mM). Após vigorosa homogeneização, a mistura foi deixada em repouso por 10 minutos à temperatura

ambiente. Em seguida, foi aquecida a 94°C por 2 minutos e colocada em gelo até ser aplicada em uma membrana de nylon por sucção à vácuo, conforme sistema **dot-blot** (**Bio Rad**), com posterior fixação por aquecimento a 80°C por 2 horas. Cada filtro de nylon foi feito em duplicata e pôde ser utilizado por diversas vezes.

VII. Hibridação com oligonucleotídeos alelo-específicos

A hibridação foi realizada com a utilização de sondas alelo-específicas para o segmento normal e para as mutações previamente descritas na literatura do códon 61 do oncogene NRAS. Tais sondas detectam o códon para a glicina e os mutantes para os aminoácidos ácido glutâmico, lisina, arginina, leucina, prolina e histidina. Em virtude da degeneração do código genético, dois códons diferentes correspondem à histidina, o CAT e o CAC, presentes respectivamente nas sondas 7 e 8. Os oligonucleotídeos utilizados como sonda para todas as mutações e para a sequência normal foram provenientes da **Clontech** (Palo Alto, CA, USA) e encontram-se relacionados na Tabela 6.

Tabela 6. Sequência dos oligonucleotídeos utilizados como sondas na hibridação alelo-específica para o códon 61. Tm = temperatura de dissociação e TI = temperatura de lavagem.

Sonda	Sequência	Correspondência/ condição	Tm (°C)	TI (°C)
1	ACA GCT GGA <u>CAA</u> GAA GAG TA	(gln) normal	58	60
2	ACA GCT GGA <u>GAA</u> GAA GAG TA	(glu) mutante	58	60
3	ACA GCT GGA <u>AAA</u> GAA GAG TA	(lys) mutante	56	58
4	ACA GCT GGA <u>CGA</u> GAA GAG TA	(arg) mutante	60	62
5	ACA GCT GGA <u>CTA</u> GAA GAG TA	(leu) mutante	58	60
6	ACA GCT GGA <u>CCA</u> GAA GAG TA	(pro) mutante	60	62
7	ACA GCT GGA <u>CAT</u> GAA GAG TA	(his1) mutante	58	60
8	ACA GCT GGA <u>CAC</u> GAA GAG TA	(his2) mutante	60	62

Marcação das sondas com isótopos radioativos

Após a hibridação, os filtros foram secos e expostos a filme de raios X por aproximadamente 24 horas. A reação de marcação dos oligonucleotídeos foi realizada em solução contendo 10 pM da sonda, 5 unidades de T4 polinucleotídeo quinase (USB), 8µl de [γ P³²]ATP (Amersham 5000 Ci/mmol; 10µCi/µl), em tampão Tris HCl 50mM pH 7,6; MgCl₂ 10 mM; DTT 0,5 mM; espermidina 0,1mM, EDTA 0,1mM, com volume final de 50µl. A mistura foi incubada a 37°C por 2 horas, interrompendo-se então a reação com 100µl TNE (Tris-HCl 10mM, pH 8,0; NaCl 100mM; EDTA 1mM, pH 8,0). Foram realizadas uma extração (v:v) com fenol/clorofórmio/alcool isoamílico (25:24:1) e uma extração (v:v) com clorofórmio/alcool isoamílico (24:1). Após purificação em coluna de Sephadex G50, a eficiência da marcação foi avaliada pela leitura da radioatividade em solução obtida pela diluição de 1µl de sonda em 3ml de líquido de cintilação, em contador de cintilação líquida LS 5000 TA-Beckman.

Pré-hibridação

Os filtros obtidos por **dot-blot** foram colocados no interior de recipientes plásticos flexíveis, com 10 ml de tampão de hibridação (concentração final: 5X SSPE, 5X Denhardt's e SDS 0,5%) e incubados por 2 horas a 48°C. A solução de SSPE 20X, usada como estoque, consistiu de 175,3g de NaCl; 27,6g de NaH₂PO₄.H₂O; 7,4g de EDTA e água q.s.p. 1000ml. Foi autoclavada e diluída conforme a necessidade. A solução-estoque de Denhardt's 50X foi composta por 5g de Ficoll, 5g de polivinilpirrolidona, 5g albumina bovina sérica e água desionizada em quantidade suficiente para atingir 500 ml.

Hibridação

Após a pré-hibridação, as sondas previamente marcadas foram adicionadas aos recipientes plásticos na razão aproximada de 5×10^6 cpm/ml de tampão e incubadas por 3 horas à temperatura de 48°C.

Lavagens

Foram realizadas 2 lavagens à temperatura ambiente por 10 e 5 minutos, respectivamente, em solução 2X SSPE e SDS 0,1%. A temperatura da terceira lavagem

foi igual a T_m+2 (T_m =temperatura de dissociação) e a solução utilizada foi 5X SSPE e SDS 0,1%, durante 10 minutos.

Após a hibridação, os filtros foram secos e expostos a filme de raios X por aproximadamente 16 horas, com intensificadores de imagem para autorradiografia a -70°C .

As hibridações foram realizadas mais de uma vez, especialmente nos filtros que apresentaram casos positivos e sempre utilizando filtros em duplicata, sendo um deles submetido à sonda normal e o outro à sonda mutante em questão.

VIII. Sequenciamento

Para as reações de sequenciamento utilizando o kit Sequenase (USB/Amersham), foram seguidos rigorosamente todos os passos recomendados pelo fabricante, conforme descrito a seguir.

Pré-tratamento enzimático do PCR

Foram colocados $5\mu\text{l}$ do produto de PCR, amplificado como o descrito anteriormente, em um tubo de 0,5 ml, adicionando-se 10 unidades de exonuclease I (10 U/ μl em Tris-HCl 20mM, pH 7,5, 2-mercaptoetanol 5mM e glicerol 50%) e 2 unidades de fosfatase alcalina de camarão (2 U/ μl em Tris-HCl 20mM, pH 7,5, Ditiotretitol 2mM, EDTA 0,1mM e glicerol 50%). As amostras foram então incubadas a 37°C por 15 minutos e, a seguir, tiveram suas enzimas inativadas a 80°C por 15 minutos.

Reação de sequenciamento

A seguir, uma alíquota (1-9 μl) de DNA do produto de PCR tratado enzimaticamente foi adicionada a uma mistura de 1 μl de primer (5-10pmol/ μl) e água, totalizando um volume de 10 μl . Foi então desnaturado a 100°C por 2 a 3 minutos e resfriado rapidamente em gelo por 5 minutos. Enquanto isso, foram colocados em quatro tubos marcados, 2,5 μl de cada mistura de terminação (dGTP 80 μM , dATP 80 μM , dCTP 80 μM , dTTP 80 μM , NaCl 50mM mais 8 μM de cada ddNTP, separadamente), mantidos à temperatura ambiente, até o momento de uso, quando foram aquecidas a 37°C .

A seguir, foram adicionados à reação no gelo, 2 μl de tampão de reação (Tris-HCl 200mM, pH 7,5; MgCl_2 100mM; NaCl 250mM), DTT (ditiotretitol) 0,1M, mistura de

marcação (dGTP, dCTP e dTTP 7,5 μ M), 0,5 μ l (5 μ Ci) de [³⁵S] dATP e 2 μ l de Sequenase DNA polimerase. A mistura foi incubada à temperatura ambiente por 5 minutos e, a seguir, teve 3,5 μ l transferidos para cada um dos tubos marcados contendo a mistura de terminação, mantendo os tubos incubados a 37°C por 5-10 minutos.

Reações de terminalização

A interrupção da reação foi levada a efeito pela adição de 4 μ l de solução **stop** (formamida 95%, EDTA 20mM, azul de bromofenol 0,05% e xilenocianol 0,05%). As amostras puderam então ser submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 6%, tampão taurina (Trisma-base, Taurina, EDTA dissódico 4mM) e uréia 7M em placas de 35x50 cm e 0,4mm de espessura (aparato **Bio Rad**), por 1,5 hora a 1500V (fonte **Bio Rad**). O tampão utilizado na eletroforese foi o mesmo utilizado na preparação do gel. A autorradiografia foi obtida após exposição do gel seco em filme de raios X, com intensificador, por aproximadamente 30-72 horas.

IX. Análise estatística

Para comparação da presença de mutações e da exposição aos pesticidas entre as 28 amostras do grupo exposto e as 20 do grupo utilizado como controle foi utilizado o teste exato de Fisher unilateral (Fisher, 1934).

Para avaliação da homogeneidade do risco relativo entre as classes de indivíduos portadores de mutação e o hábito de fumar, nos grupos exposto e controle, foi usada a estimativa descrita em Paula (1982) e Bishop *et al.* (1984).

Foram realizadas comparações entre os níveis de resíduos totais, para os isômeros de DDT e de HCH entre os indivíduos que apresentaram alterações no protooncogene NRAS e os que não apresentaram tais alterações, empregando a análise de variância trifatorial com interação e por modelo aditivo (sem interação). Foi realizado também o teste *t* de Student com correção de Welch para os graus de liberdade com o intuito de verificar a possível influência do tempo de exposição aos compostos sobre a incidência de alterações nos indivíduos expostos. Os testes estatísticos seguiram metodologias apresentadas por Box *et al.* (1978).

RESULTADOS

1. Extração de DNA

Foi extraído DNA de material obtido após cultura de linfócitos de 48 indivíduos, sendo 28 pertencentes ao grupo exposto ocupacionalmente a pesticidas e 20 ao grupo controle. Esse material havia sido mantido em lâminas e armazenado por cerca de cinco anos à temperatura ambiente. Dois procedimentos de cultivo foram utilizados na época: o de Hashimoto (1990) na obtenção das preparações e o convencional, destinado a permitir coloração usual, e aquele para verificação de trocas entre cromátides irmãs (ICT). Segundo os testes realizados, a extração foi eficaz, independente da técnica empregada (Muniz et al., 1995). No presente estudo, porém, foram utilizadas lâminas com Giemsa pelo método usual e também lâminas sem coloração, excluindo-se aquelas obtidas para a análise de ICT de células e para estudos de citogenética. A colinaína (BRDU) é cultura um agente subitamente mutagênico.

Para extração de DNA, numerosos testes foram realizados no sentido de estabelecer a metodologia mais adequada.

Foi observado que as melhores condições de extração compreendiam tratamento com tempo de atuação de proteinase K prolongado, de cerca de 12 horas, e concentração maior de SDS no tampão. A quantidade de DNA obtida com esse processo mostrou-se extremamente variável, o que pode ser observado na fotografia em gel de agarose após eletroforese de fragmentos amplificados do códon 61 do gene NRAS (Figura 3). Tal variabilidade foi confirmada, em alguns casos, através da avaliação em espectrofotômetro, utilizando-se o comprimento de onda 250 nm (excitação) e 260 nm (absorção). Por questão de padronização e em função do pequeno volume obtido, foram utilizados de 1 a 2,5 µl de DNA extraído para o procedimento de amplificação por PCR.

RESULTADOS

RESULTADOS

I. Extração de DNA

Foi extraído DNA de material obtido após cultura de linfócitos de 48 indivíduos, sendo 28 pertencentes ao grupo exposto ocupacionalmente a pesticidas e 20 ao grupo controle. Esse material havia sido montado em lâminas e armazenado por cerca de cinco anos à temperatura ambiente. Dois procedimentos de cultivo foram utilizados na época por Hashimoto (1990) na obtenção das preparações: o convencional, destinado a posterior coloração usual, e aquele para verificação de trocas entre cromátides irmãs (TCI). Segundo os testes realizados, a extração foi eficaz, independente da técnica empregada (Nunes *et al.*, 1995). No presente estudo, porém, foram utilizadas lâminas coradas com Giemsa pelo método usual e também lâminas sem coloração, excluindo-se aquelas obtidas para a análise de TCI, uma vez que nessa metodologia é adicionada bromodeoxiuridina (BRDU) à cultura, um agente sabidamente mutagênico.

Para extração do DNA, numerosos testes foram realizados no sentido de estabelecer a metodologia mais adequada.

Foi observado que as melhores condições de extração compreenderam tratamento com tempo de atuação de proteinase K prolongado, de cerca de 12 horas, e concentrações maiores de SDS no tampão. A quantidade de DNA obtida com esse processo mostrou-se extremamente variável, o que pode ser observado na fotografia de um gel de agarose após eletroforese de fragmentos amplificados do códon 61 do protooncogene NRAS (Figura 3). Tal variabilidade foi confirmada, em alguns casos, através de avaliação em espectrofotômetro, utilizando-se o comprimento de onda 260 nm (própria para detecção de ácidos nucleicos). Por questão de padronização e em função do pequeno volume obtido, foram utilizados de 1 a 2,5 μ l de DNA extraído para os procedimentos de amplificação por PCR.

II. Polimorfismo de conformação de cadeia única (SSCP)

Os fragmentos dos códons 12 e 13 do protooncogene NRAS de 46 amostras (20 controles e 26 aplicadores) foram amplificadas por PCR e submetidos à técnica de SSCP.

Padrões eletroforéticos indicativos de mutação foram observados em 12 amostras, sendo quatro provenientes de indivíduos do grupo controle (CNF4, CNF8, CNF9 e CNF5) e oito do grupo exposto (ANF3, ANF5, ANF8, ANF12, AF4, AF7, AF15 e AF16). Esses padrões e aqueles de casos aparentemente sem mutação podem ser observados nas Figuras 4 a 7.

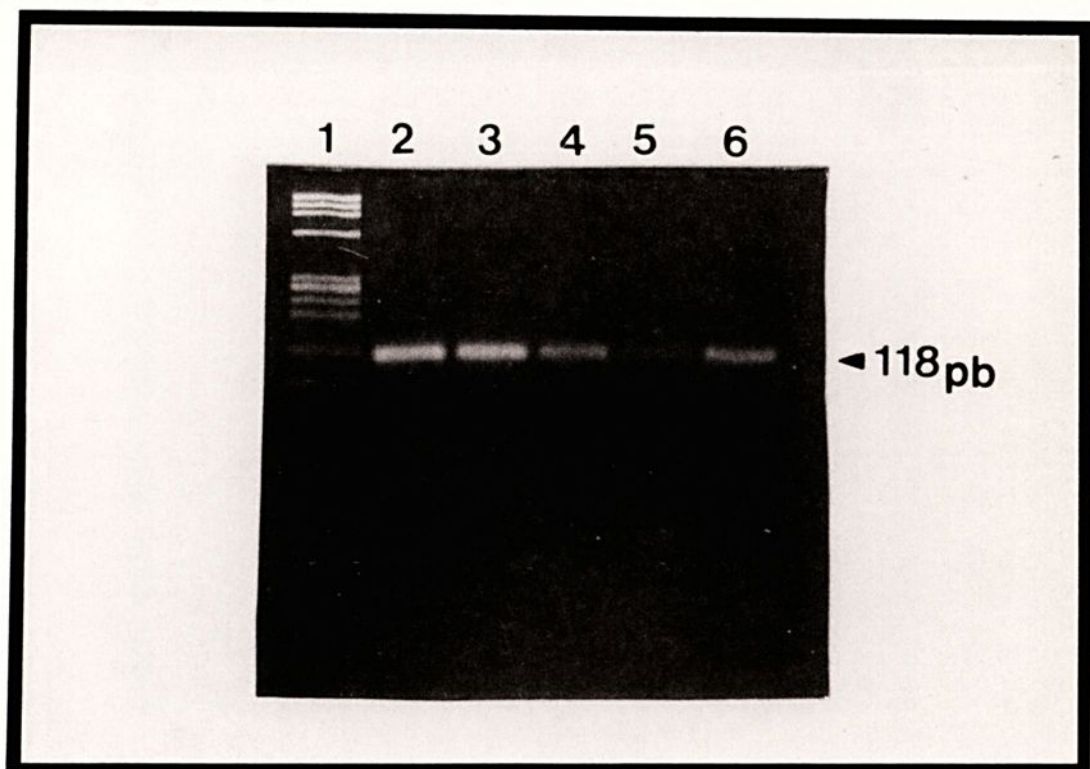


Figura 3. Eletroforese em gel de agarose 3% de amostras de fragmentos amplificados com o códon 61 do protooncogene NRAS. Na sequência, da esquerda para a direita, ϕ X 174 Hae III, DNA controle extraído de leucócitos de sangue fresco, quatro amostras extraídas de lâminas de cultura de linfócitos de sangue periférico.

II. Polimorfismo de conformação de cadeia única (SSCP)

Os fragmentos dos códons 12 e 13 do protooncogene NRAS de 48 amostras (20 controles e 28 aplicadores) foram amplificados por PCR e submetidos à técnica de SSCP.

Padrões eletroforéticos indicativos de mutação foram observados em 12 amostras, sendo quatro provenientes de indivíduos do grupo controle (CNF4, CNF8, CNF9 e CF5) e oito do grupo exposto (ANF3, ANF5, ANF8, ANF12, AF4, AF7, AF15 e AF16). Esses padrões e aqueles de casos aparentemente sem mutação podem ser observados nas Figuras 4 a 7.

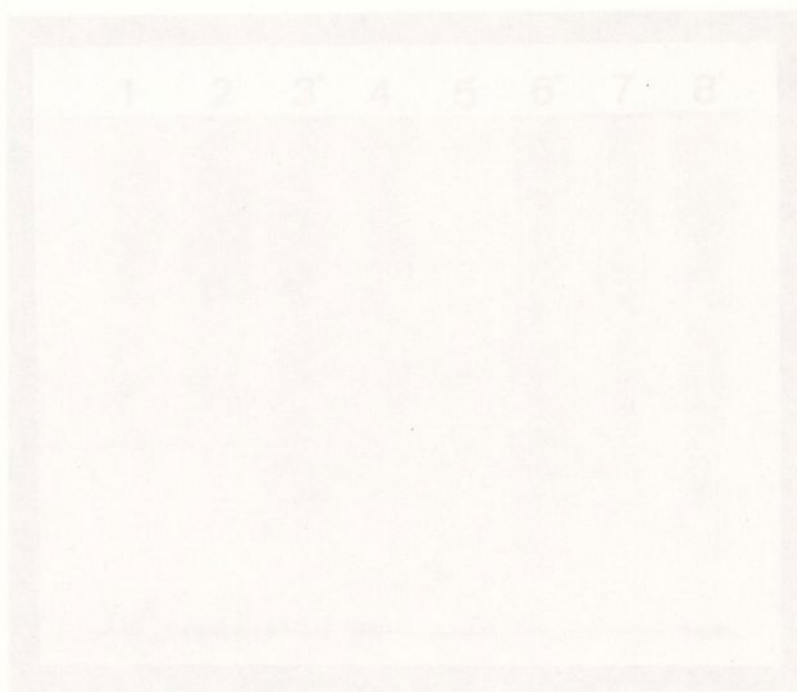


Figura 4. Fotografia do gel de poliacrilamida após eletroforese de oito amostras de fragmentos dos códons 12 e 13 (NRAS) amplificados, submetidos à técnica de SSCP não-radicalativa. Observam-se padrões anormais de migração eletroforética (linhas 4 e 7), correspondentes às amostras CNF9 e CNF4 em comparação ao DNA controle (linhas 3°, 6° e 8°). As linhas 1, 2 e 5 são referentes aos casos ANF11, AF15 e CNF2, respectivamente.

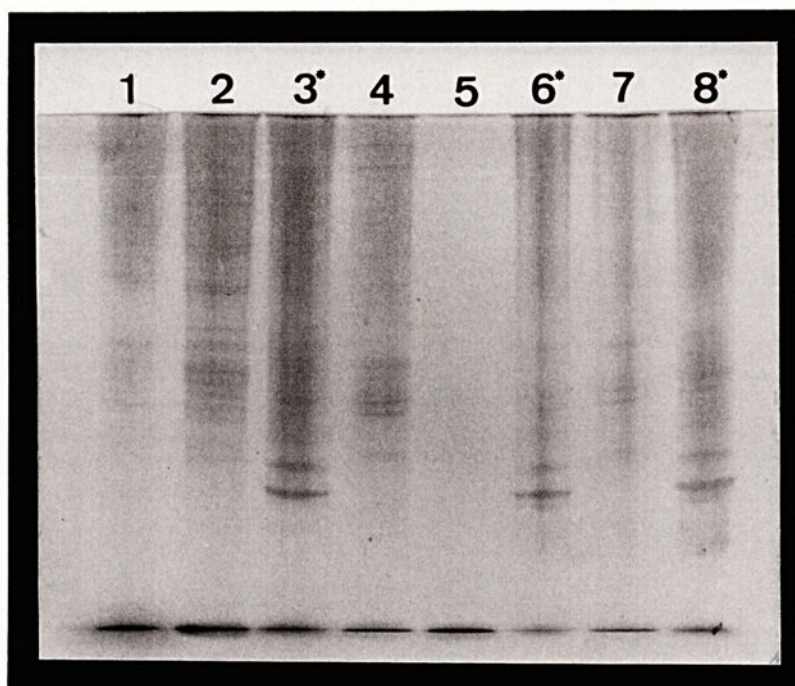


Figura 4. Fotografia de gel de poliacrilamida após eletroforese de oito amostras de fragmentos dos códons 12 e 13 (NRAS) amplificados, submetidos à técnica de SSCP não-radioativa. Observam-se padrões anormais de migração eletroforética (linhas 4 e 7), correspondentes às amostras CNF9 e CNF4 em comparação ao DNA controle (linhas 3*, 6* e 8*). As linhas 1, 2 e 5 são referentes aos casos ANF11, AF15 e CNF2, respectivamente.

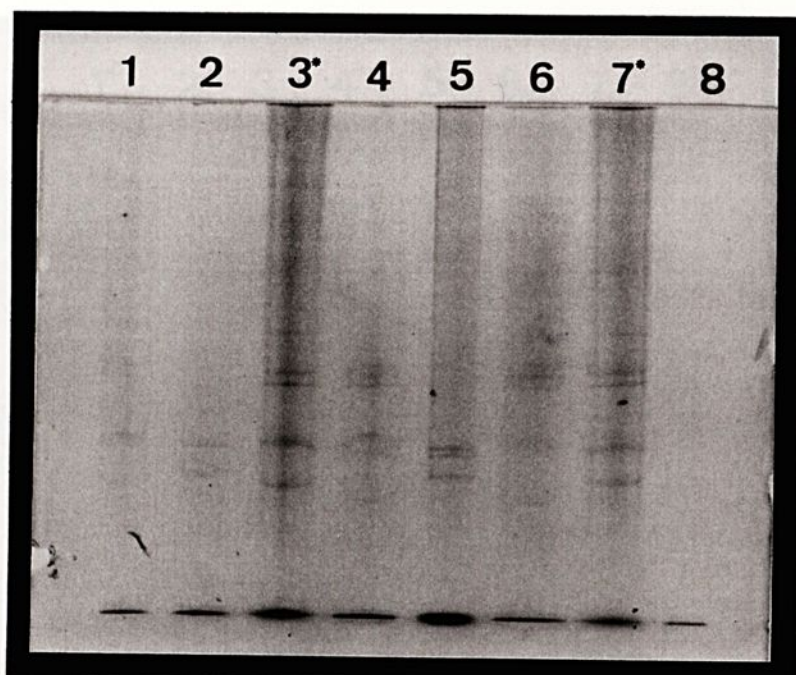


Figura 5. Fotografia de gel de poliacrilamida após eletroforese de oito amostras de fragmentos dos códons 12 e 13 (NRAS) amplificados, submetidos à técnica de SSCP não-radioativa. Observam-se padrões anormais de migração eletroforética (linhas 2, 4, 5 e 6), correspondentes às amostras ANF8, AF4, AF16 e ANF3, em comparação ao DNA controle (linhas 3* e 7*). A linha 8 é referente à amostra CNF2.

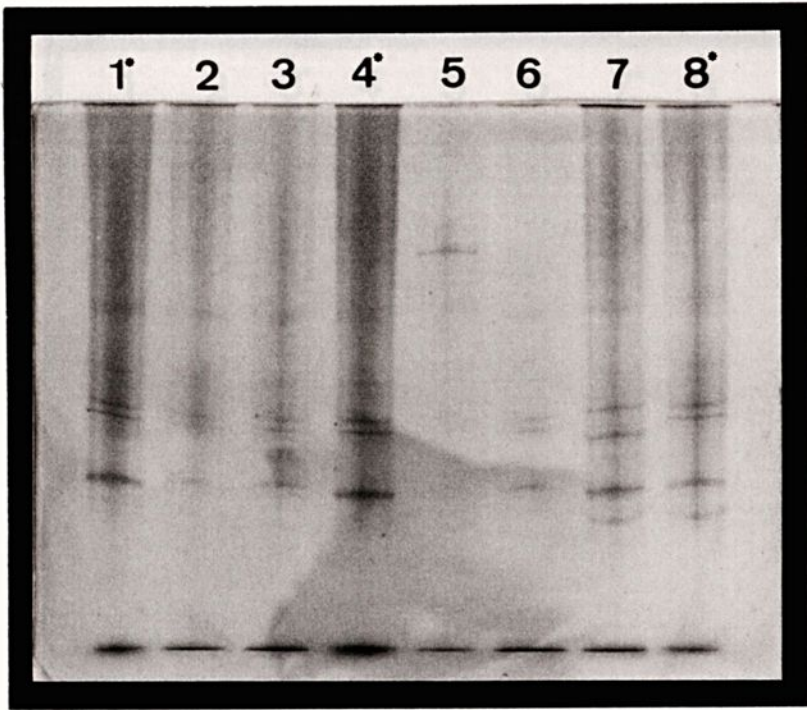


Figura 6. Fotografia de gel de poliacrilamida após eletroforese de oito amostras de fragmentos dos códons 12 e 13 (NRAS) amplificados, submetidos à técnica de SSCP não-radioativa. Observam-se padrões anormais de migração eletroforética (linhas 3, 6 e 7), correspondentes às amostras ANF5, CNF8 e AF7, em comparação ao DNA controle (linhas 1*, 4* e 8*). A linha 2 é referente à amostra AF10.

III. Hibridação com oligonucleotídeos alelo-específicos

Os fragmentos dos códons 12 e 13 do proto-oncogene NRAS de 43 amostras (20 controles e 23 pacientes) foram amplificadas por PCR e fixados em filtro de nylon pelo sistema dot-blot. Após a hibridação com os oligonucleotídeos alelo-específicos relacionados na Tabela 5 (página 34), foram observados cinco casos com suspeita de mutação, sendo três deles referentes ao DNA de indivíduos do grupo exposto (AF3, AF9 e ANF5) e dois ao do grupo controle (CF3 e CNF11).

As alterações detectadas corresponderam à troca da glicina pelos aminoácidos arginina (CNF11, AF9, AF13, ANF8) e histidina (CF3). Nesses casos, os resultados foram inequívocos e o

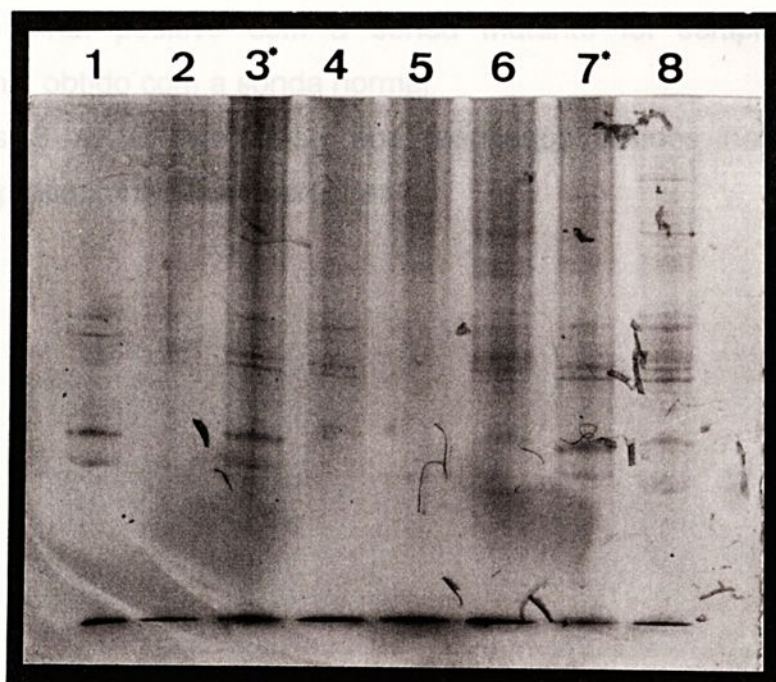


Figura 7. Fotografia de gel de poliacrilamida após eletroforese de oito amostras de fragmentos dos códons 12 e 13 (NRAS) amplificados, submetidos à técnica de SSCP não-radioativa. Observam-se padrões anormais de migração eletroforética (linhas 1, 6 e 8), correspondentes às amostras CF5, AF15 e ANF12, em comparação ao DNA controle (linhas 3* e 7*). As linhas 2, 4 e 5 são referentes às amostras CNF9, CNF4 e ANF11, respectivamente.

III. Hibridação com oligonucleotídeos alelo-específicos

Os fragmentos dos códons 61 do protooncogene NRAS de 48 amostras (20 controles e 28 aplicadores) foram amplificados por PCR e fixados em filtros de nylon pelo sistema **dot-blot**. Após a hibridação com os oligonucleotídeos alelo-específicos relacionados na Tabela 6 (página 34), foram observados cinco casos com suspeita de mutação, sendo três deles referentes ao DNA de indivíduos do grupo exposto (AF3, AF9 e ANF8) e dois ao do grupo controle (CF3 e CNF11).

As alterações detectadas corresponderam à troca da glicina pelos aminoácidos arginina (CNF11, AF9, AF13, ANF8) e histidina (CF3). Nesses casos, os resultados foram inequívocos e o sinal positivo com a sonda mutante foi sempre comparável em intensidade ao sinal obtido com a sonda normal.

As Figuras 8 a 10 referem-se aos resultados obtidos nas hibridações dos fragmentos que apresentaram tais alterações.



Figura 8. A Esquema da aplicação das amostras na membrana de nylon. B Hibridação de 13 amostras de fragmentos do codon 61 (NRAS) amplificadas com sondas de sequências correspondentes aos alelos normal (Gln) e mutante (Arg). Observar que a reação é positiva para as amostras b2' (CNF11) e d3 (AF13), que mostram a mesma intensidade de radioatividade nas posições hibridadas com sondas normal e mutante. A amostra f1 foi repetida em outra membrana.

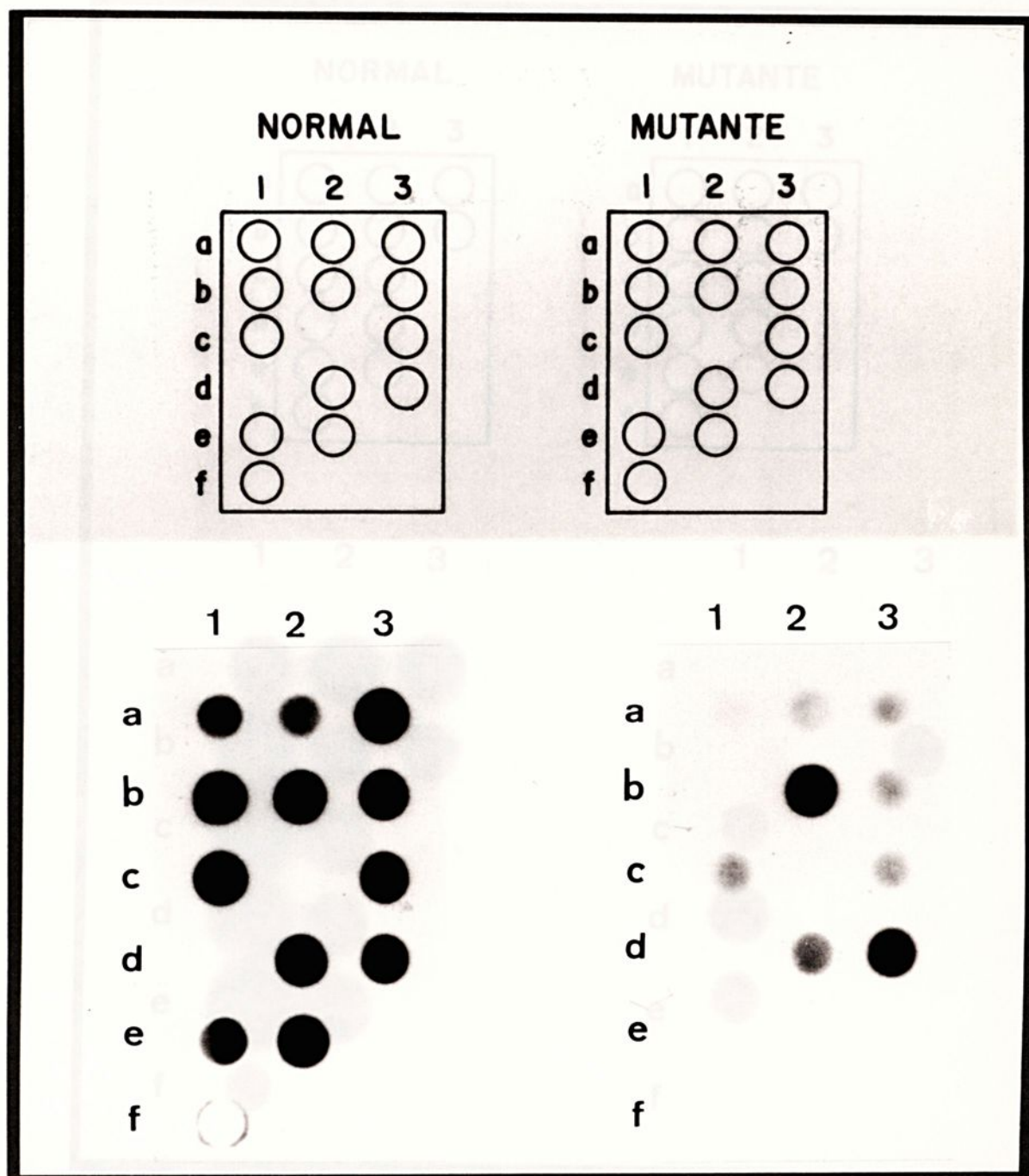


Figura 8. A. Esquema da aplicação das amostras na membrana de nylon. B. Hibridação de 13 amostras de fragmentos do códon 61 (NRAS) amplificados com sondas de sequências correspondentes aos alelos normal (Gln) e mutante (Arg). Observar que a reação é positiva para as amostras b2 (CNF11) e d3 (AF13), que mostram a mesma intensidade de radioatividade nas posições hibridadas com sondas normal e mutante. A amostra f1 foi repetida em outra membrana.

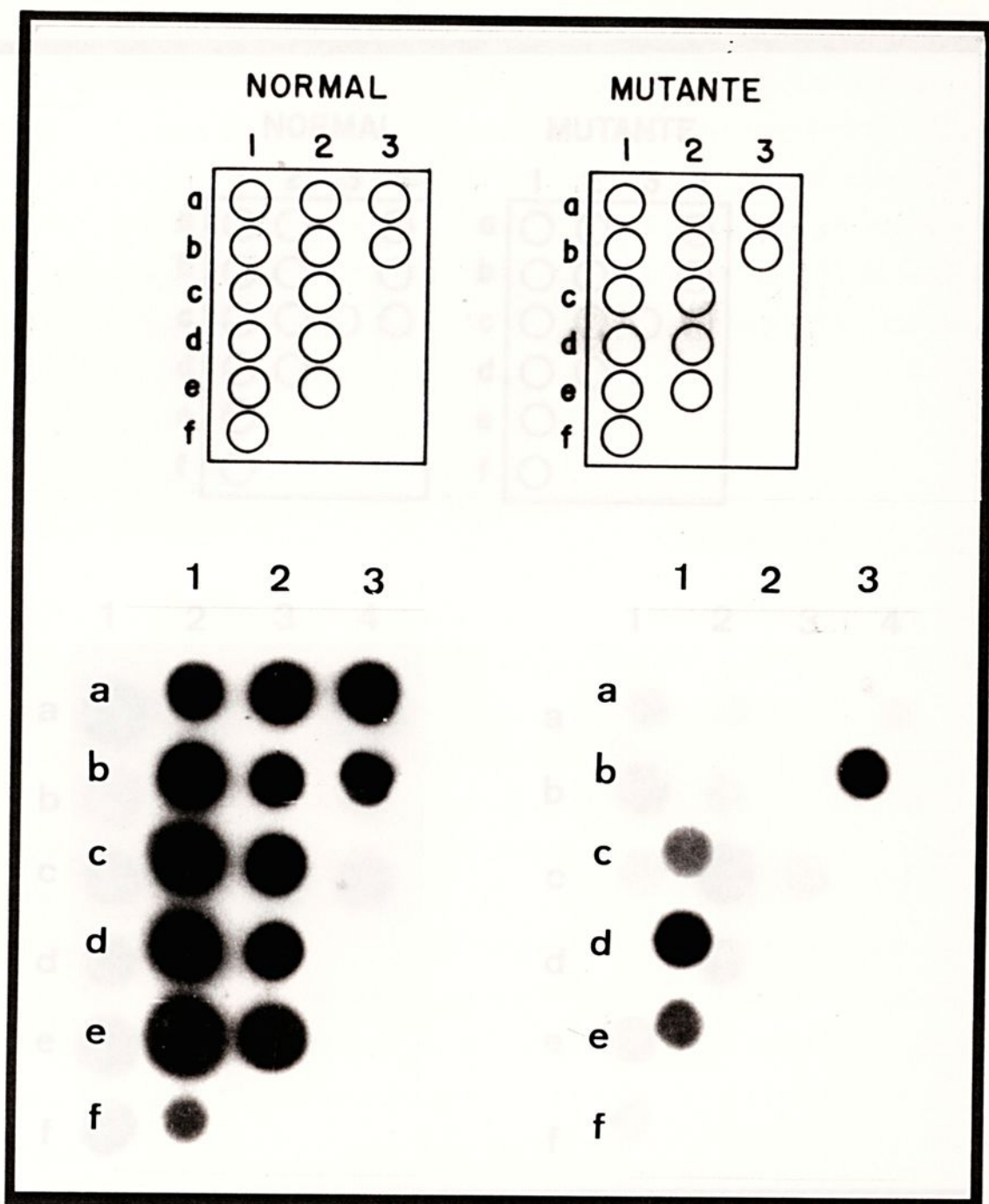


Figura 9. A. Esquema da aplicação das amostras na membrana de nylon. B. Hibridação de 13 amostras de fragmentos do códon 61 (NRAS) amplificados com sondas de sequências correspondentes aos alelos normal (Gln) e mutante (Arg). Observar que a reação é positiva para as amostras d1 (AF9) e b3 (ANF8), que mostram a mesma intensidade de radioatividade nas posições hibridadas com sondas normal e mutante.

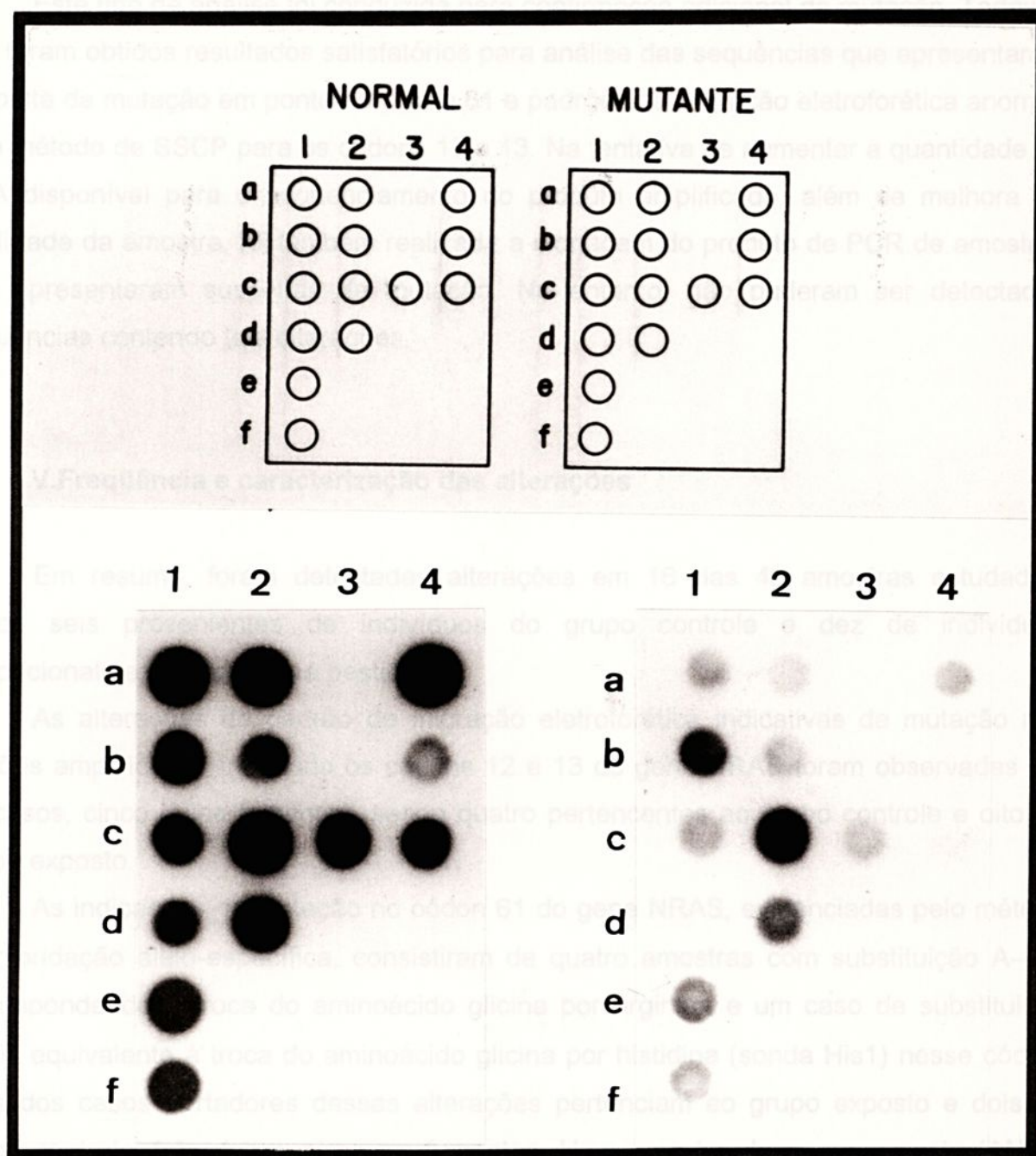


Figura 10. A. Esquema da aplicação das amostras na membrana de nylon. B. Hibridação de 14 amostras de fragmentos do códon 61 (NRAS) amplificados com sondas de sequências correspondentes aos alelos normal (Gln) e mutante (His1). Observar que a reação é positiva para a amostra c2 (CF3), que mostra a mesma intensidade de radioatividade nas posições hibridadas com sondas normal e mutante.

IV. Sequenciamento direto do fragmento amplificado

Este tipo de análise foi conduzida para confirmação adicional da mutação. Todavia, não foram obtidos resultados satisfatórios para análise das sequências que apresentaram suspeita de mutação em ponto no códon 61 e padrões de migração eletroforética anormal pelo método de SSCP para os códons 12 e 13. Na tentativa de aumentar a quantidade de DNA disponível para o sequenciamento do produto amplificado, além de melhora na qualidade da amostra, foi também realizada a clonagem do produto de PCR de amostras que apresentaram suspeitas de mutação. No entanto, não puderam ser detectadas sequências contendo tais alterações.

V. Frequência e caracterização das alterações

Em resumo, foram detectadas alterações em 16 das 48 amostras estudadas, sendo seis provenientes de indivíduos do grupo controle e dez de indivíduos ocupacionalmente expostos a pesticidas.

As alterações do padrão de migração eletroforética indicativas de mutação nas regiões amplificadas contendo os códons 12 e 13 do gene NRAS foram observadas em 12 casos, cinco deles fumantes, sendo quatro pertencentes ao grupo controle e oito ao grupo exposto.

As indicações de mutação no códon 61 do gene NRAS, evidenciadas pelo método da hibridação alelo-específica, consistiram de quatro amostras com substituição A→G, correspondendo à troca do aminoácido glicina por arginina e um caso de substituição A→T, equivalente à troca do aminoácido glicina por histidina (sonda His1) nesse códon. Três dos casos portadores dessas alterações pertenciam ao grupo exposto e dois ao grupo controle, três dos quais eram fumantes. Uma amostra do grupo exposto (ANF8) apresentou alterações tanto no fragmento contendo os códons 12 e 13 quanto no que continha o códon 61.

Desse modo, considerando-se a amostra total, foram detectadas alterações no gene NRAS em 30% dos indivíduos pertencentes ao grupo controle e em 39,3% dos indivíduos expostos ocupacionalmente a pesticidas.

Em relação ao hábito de fumar, entre os integrantes da amostra que exibiram indicação de mutação, dois em seis indivíduos do grupo controle eram tabagistas (33,3%), enquanto no grupo de indivíduos expostos seis em dez indivíduos (60%) apresentavam esse hábito. Quanto ao uso esporádico de pesticidas, dois controles fizeram tal referência, ambos com suspeita de mutações no códon 61 (CF3 e CNF11).

A Tabela 7 mostra os tipos de alterações detectadas no gene NRAS e as características dos seus portadores.

VI. Análise estatística

Tabela 7. Tipos de alterações observadas no gene NRAS, idade, tempo de exposição e pesticidas manipulados por dez indivíduos do grupo exposto e seis controles.

Indivíduo	Códon mutado	Idade/tempo exposição (anos)	Pesticidas manipulados
AF13	códon 61 (Gln → Arg)	48/22	BHC, DDT, Fenitrothion, Malathion, Propoxur, Temefós
AF15	códons 12/13	51/24	BHC, DDT, Fenitrothion, Malathion, Propoxur, Temefós
AF16	códons 12/13	48/23	BHC, DDT, Malathion, Propoxur, Temefós
AF4	códons 12/13	49/30	BHC, DDT, Clordane, Deltametrina, Diazinon, Fenitrothion, Malation, Propoxur, Temefós
AF7	códons 12/13	48/17	BHC, DDT
AF9	códon 61 (Gln → Arg)	58/32	BHC, DDT, Fenitrothion, Malation, Propoxur, Temefós
ANF12	códons 12/13	54/10	BHC, DDT, Malathion, Propoxur, Temefós
ANF3	códons 12/13	52/28	BHC, DDT, Deltametrina, Fenitrothion, Propoxur
ANF5	códons 12/13	61/26	BHC, DDT, Cythion, Diazinon, Fenitrothion, Malation, Propoxur, Temefós
ANF8	códon 61 (Gln → Arg) códons 12/13	60/28	BHC, DDT, Fenitrothion, Temefós
CF3	códon 61 (Gln → His)	51	Rodiatox*
CF5	códons 12/13	42	
CNF11	códons 12/13	49	
CNF11	códon 61 (Gln → Arg)	37	pesticidas usados em pulverização de laranjas*
CNF4	códons 12/13	52	
CNF8	códons 12/13	55	

* uso esporádico



VI. Análise estatística

A frequência de alterações entre os indivíduos expostos a pesticidas não foi significativamente diferente daquela observada entre os não expostos ($p = 0,46$; Tabela 8). As frequências relativas dos fumantes expostos e do grupo controle, 38 e 40% respectivamente, também não diferiram.

O risco relativo da presença de alteração no gene NRAS foi de 41% maior nos indivíduos fumantes do grupo exposto em relação aos controles não fumantes, como pode ser deduzido da Tabela 9. A avaliação foi adotada em função da impossibilidade de realização de testes exatos devido ao pequeno tamanho da amostra. O resultado indica uma estimativa de risco aumentado decorrente de dois fatores comparados a um controle neutro. É interessante que, adotando-se a frequência de mutação e não a de indivíduos com alteração, verificou-se que o risco relativo de anomalia no NRAS foi 56% maior para os aplicadores não fumantes comparados com os controles não fumantes. No caso de controles fumantes *versus* não fumantes, o risco foi 48% maior para os primeiros.

Foram realizadas também comparações por análise de variância trifatorial dos resíduos de DDT e HCH com interação (Tabelas 10 e 11) e por modelo aditivo sem interação (Tabelas 12 e 13) para detecção de diferenças entre os parâmetros considerados. Pode-se verificar que os níveis de HCH nos aplicadores é significativamente maior ($F = 9,25$; $P < 0,005$) em relação aos indivíduos não expostos. O mesmo foi observado para os níveis referentes à exposição ao DDT ($F = 4,71$; $P < 0,037$), embora com valores menores que os anteriores. As demais comparações não indicaram diferenças significativas entre as médias analisadas.

A comparação das médias do tempo de exposição a pesticidas no grupo dos aplicadores com ou sem alterações no NRAS não mostrou diferenças estatisticamente significativas ($t = 0,97$; $P < 0,35$), conforme pode ser observado na Tabela 14.

NRAS	F	%	NP	%	Total de indivíduos	F	%	NP	%	Total de indivíduos
com alteração	8	38	5	42	10	2	40	4	27	6
sem alteração	10	62	8	58	18	8	80	11	73	14
Total de indivíduos	15		12		28	5		15		20

* ANOVA apresentou alteração nos níveis 12, 13 e 61.

Tabela 8. Frequência de alterações nos códons 12, 13 e 61 do gene NRAS nos grupos controle e exposto.

Códons NRAS	Grupo		Total	
	Exposto (%)	Controle (%)		
com alteração	10 (35,7)	6 (30,0)	16	$p = 0,46$
sem alteração	18 (64,3)	14 (70,0)	32	
Total	28	20	48	

Tabela 9. Frequências de alterações nos códons 12, 13 e 61 do gene NRAS em indivíduos fumantes e não-fumantes nos grupos exposto e controle.

Códons NRAS	Exposto					Controle				
	F	%	NF	%	Total de indivíduos	F	%	NF	%	Total de indivíduos
com alteração	6	38	5*	42	10	2	40	4	27	6
sem alteração	10	62	8	67	18	3	60	11	73	14
Total de indivíduos	16		12		28	5		15		20

* ANF8 apresentou alteração nos códons 12,13 e 61.

Tabela 10. Comparação por análise de variância trifatorial dos resíduos de HCH com interação.

Parâmetros analisados	F	p
aplicadores x controles (A)	9,25	0,005
fumantes x não fumantes (B)	0,44	0,511
presença de alterações no gene NRAS x ausência (C)	0,04	0,849
A x B	0,51	0,479
A x C	0,11	0,747
B x C	0,03	0,874
A x B x C	0,04	0,835

Tabela 11. Comparação por análise de variância trifatorial dos resíduos de DDT com interação.

Parâmetros analisados	F	p
aplicadores x controles (A)	4,71	0,037
fumantes x não fumantes (B)	0,01	0,912
presença de alterações no gene NRAS x ausência (C)	1,12	0,298
A x B	0,01	0,932
A x C	0,75	0,393
B x C	0,13	0,719
A x B x C	0,08	0,785

Tabela 12. Comparação por análise de variância trifatorial dos resíduos de HCH pelo modelo aditivo (sem interação).

Parâmetros analisados	F	p
aplicadores/controles	9,33	0,004
fumantes/não fumantes	1,10	0,300
presença alterações no protoncogene NRAS / ausência	0,04	0,851

Tabela 13. Comparação por análise de variância trifatorial dos resíduos de DDT pelo modelo aditivo (sem interação).

Parâmetros analisados	F	p
aplicadores/controles	6,45	0,015
fumantes/não fumantes	0,11	0,745
presença alterações no protoncogene NRAS / ausência	2,41	0,129

Tabela 14. Teste *t* de Student com correção de Welch para comparação das médias dos tempos de exposição dos aplicadores que apresentaram ou não alterações no protoncogene NRAS.

	N	$\bar{X} \pm s\bar{x}$
expostos com alteração	10	28,2 $\pm$ 3,29
expostos sem alteração	18	27,0 $\pm$ 2,83

t = 0,97

DISCUSSÃO

No presente trabalho foram analisadas amostras de DNA provenientes da análise citogenética, realizada por Machado (1993), de 28 indivíduos ocupacionalmente expostos a pesticidas que trabalhavam na SUCEN, SR - 9 de São José do Rio Preto, SP. Essas amostras foram comparadas com as de um grupo controle constituído de 20 funcionários públicos de instituições de ensino locais. Os grupos apresentaram tamanhos diferentes em função da redução da participação de alguns dos indivíduos entrevistados ou da falta de amostras de sangue de alguns dos indivíduos do grupo controle.

A SUCEN é uma instituição não governamental, cuja finalidade é a de promover a saúde pública e a segurança ambiental. Ela é uma das principais organizações não governamentais de São Paulo, com uma rede de atuação em todo o Estado. A SUCEN atua em áreas de saúde pública, meio ambiente, educação e cultura. Ela é uma das principais organizações não governamentais de São Paulo, com uma rede de atuação em todo o Estado. A SUCEN atua em áreas de saúde pública, meio ambiente, educação e cultura.

Todos os participantes do grupo exposto trabalhavam em atividades relacionadas com a aplicação de pesticidas em áreas de saúde pública, meio ambiente, educação e cultura. Eles eram funcionários da SUCEN, SR - 9 de São José do Rio Preto, SP. Eles eram funcionários da SUCEN, SR - 9 de São José do Rio Preto, SP. Eles eram funcionários da SUCEN, SR - 9 de São José do Rio Preto, SP. Eles eram funcionários da SUCEN, SR - 9 de São José do Rio Preto, SP.

Uma das principais atividades da SUCEN é a aplicação de pesticidas em áreas de saúde pública, meio ambiente, educação e cultura. Ela é uma das principais organizações não governamentais de São Paulo, com uma rede de atuação em todo o Estado. A SUCEN atua em áreas de saúde pública, meio ambiente, educação e cultura. Ela é uma das principais organizações não governamentais de São Paulo, com uma rede de atuação em todo o Estado. A SUCEN atua em áreas de saúde pública, meio ambiente, educação e cultura.

Entre as aplicações de pesticidas que fazem parte do trabalho da SUCEN, Minelli (1993), do Instituto de Química da UNESP (Araraquara, SP), observou que mais de 80% dos trabalhadores apresentavam níveis de DDT total no plasma acima de 30 µg/L, ou seja, acima do valor máximo permitido pela Norma Regulamentadora NR-7 para níveis de DDT (Manual de Legislação, 1994, Anexo 1, item 15). Os níveis de DDT no plasma são considerados altos para áreas com valores inferiores a 7,5 e 16,5 µg/L para aqueles com níveis abaixo

DISCUSSÃO

Embora alguns indivíduos tenham apresentado níveis elevados de pesticidas, essas amostras

DISCUSSÃO

No presente trabalho, foram analisadas amostras de DNA provenientes da análise citogenética, realizada por Hashimoto (1990), de 28 indivíduos ocupacionalmente expostos a pesticidas que trabalhavam na SUCEN, SR - 8 de São José do Rio Preto, SP. Essas amostras foram comparadas àquelas de um grupo controle constituído de 20 funcionários públicos de instituições da mesma cidade. Os grupos apresentaram tamanhos diferentes em função da recusa na participação por parte de algumas das pessoas entrevistadas ou desistência quando da necessidade de repetição de alguns exames.

A SUCEN é uma instituição com organização rígida e filosofia de trabalho bastante particular, características incorporadas pelos seus funcionários. Os trabalhadores apresentam uma baixa rotatividade empregatícia e a maioria daqueles que fizeram parte da amostra encontra-se desempenhando as mesmas atividades exercidas por ocasião da realização dos exames (1987-88). Mesmo os que se aposentaram continuam frequentando as sedes da SUCEN onde atuaram.

Todos os participantes do grupo exposto trabalharam total ou parcialmente nas campanhas de erradicação da malária e da doença de Chagas, que resultaram em elevada exposição ocupacional aos organoclorados DDT e HCH e outros pesticidas. Muitos dos que manipularam esses compostos afirmaram não ter feito uso de qualquer proteção, ficando inclusive com o corpo coberto pelo pesticida, especialmente por HCH.

Uma das funções dos aplicadores, segundo seus relatos e aqueles citados no estudo feito por Gonçalves (1991), consistia na pesagem dos compostos a serem utilizados, o que era realizado na sede da SUCEN. A diluição dos pesticidas era feita no próprio local de aplicação, tanto na zona rural quanto urbana dos municípios pertencentes ao seu setor de trabalho. Para os deslocamentos, utilizavam uma viatura na qual transportavam também água, comida, instrumentos de trabalho e venenos. A SUCEN, durante vários anos, não forneceu equipamentos de proteção individual, exceto capacete. Atualmente estão disponíveis máscaras, luvas, macacões e capacetes com viseiras ou óculos, porém alguns trabalhadores simplesmente os rejeitam. É evidente que a não utilização desses equipamentos de proteção ou eventuais acidentes podem aumentar o nível de exposição a pesticidas.

Entre os aplicadores da SUCEN que fazem parte do presente trabalho, Minelli (1993), do Instituto de Química da UNESP (Araraquara, SP), observou que mais de 80% dos examinados apresentaram valores de DDT total no plasma acima de $30\mu\text{g/l}$, ou seja, do valor normal estabelecido pela Norma Regulamentadora NR-7 para resíduos de DDT (Manual de Legislação Atlas, 1984; Tabela 15). Os níveis variaram de 35,4 a $473,5\mu\text{g/l}$ para aqueles com valores alterados e de 7,5 a $16,6\mu\text{g/l}$ para aqueles com níveis abaixo desse limite, fornecendo uma concentração média total no soro de $76,9\mu\text{g/l}$ (Tabela 3). Embora alguns indivíduos tenham apresentado medidas muito elevadas, essas ainda es



Tabela 15. Parâmetros biológicos para controle de exposição a agentes químicos, segundo a Norma Regulamentadora NR - 7.

Pesticidas Organoclorados	Índice biológico de exposição (IBE)		Valor normal (µg/l)	Limite de tolerância biológica (LTB) (µg/l)
	material biológico	análise		
DDT	plasma	DDT	30	500
Dieldrin	sangue	Dieldrin	02	150
Endrin	sangue	Endrin	02	50
Lindano (γ HCH)	sangue	Lindano	04	20

Valor Normal: valores encontrados em amostras populacionais sem exposição ocupacional ao agente químico

IBE: toda e qualquer substância endógena ou exógena no organismo cuja determinação nos fluidos biológicos, tecidos, ar exalado, avalie a intensidade da exposição ocupacional a agentes químicos

LTB: alteração e/ou concentração máximas que não podem ser ultrapassadas por uma substância exógena no organismo

tão abaixo do limite de tolerância biológica (500µg/l no plasma), que é a concentração máxima que não pode ser ultrapassada quando da avaliação da intensidade da exposição ocupacional a agentes químicos.

Em relação ao HCH, a legislação não prevê valores normais ou limite de tolerância biológica para o composto total, citando apenas o isômero γ -HCH (lindano) pois, segundo Gonçalves (1991), essa é a fração com maior potencialidade inseticida. Como a análise foi realizada em plasma e a legislação refere os dados em sangue total, a comparação direta não pode ser feita. De qualquer modo, os níveis nos aplicadores apresentaram-se elevados, com uma concentração média de 32,4µg/l e variação entre 6,9 a 129,9µg/l para aqueles com valores alterados e 3,8µg/l para o único indivíduo com valor normal. Observando-se como limite de tolerância biológica 20µg/l, que corresponde ao do lindano, pode ser constatado que 50% dos casos analisados apresentaram medidas de HCH total acima daquela estabelecida, entre os quais alguns com 5 a 6 vezes esse valor. Considerando-se apenas o lindano como índice de exposição a HCH, entretanto, todos os aplicadores apresentaram valores normais.

Em relação ao grupo controle, do qual Minelli (1993) analisou 16 indivíduos (Tabela 5), foi observado que, entre os isômeros do HCH, o β foi encontrado em maior concentração, seguido do α -HCH e do γ -HCH, respectivamente. Em resumo, todos os casos apresentaram valores normais. Entretanto, ao serem consideradas as contribuições dos isômeros α e β -HCH e o mesmo limite estabelecido para o lindano (4µg/l), 11 indivíduos estão com níveis abaixo do limite de valor normal (entre zero e 3,9µg/l) e 5 com valores alterados (entre 4,3 e 7,7µg/l), sendo a concentração média de 3,7µg/l. O p,p'-DDE, metabólito do p,p'-DDT, foi encontrado em todos os indivíduos e o p,p'-DDT em quinze deles. Os metabólitos o,p'-DDT e p,p'-DDD não foram detectados em nenhum dos casos. A concentração média de DDT total do grupo foi 15,8µg/l, estando abaixo do limite de valor normal estabelecido para DDT, de 30µg/l. Somente uma amostra apresentou nível de DDT acima do valor normal (32,9µg/l) e nas demais, foram observadas medidas situadas no intervalo de 5,1 a 22,9µg/l. Esses dados estão de acordo com o fato desse grupo não referir exposição a pesticidas, com exceção de dois indivíduos (CF3 e CNF4) que relataram seu uso esporádico em atividades auxiliares a terceiros (Tabela 14). Um deles (CF3) citou uma intoxicação aguda com o composto Rodiattox, ocorrida há mais de vinte anos, a partir da qual evitou qualquer contato com pesticidas.

Como pode ser observado a partir dos dados das Tabelas 3 e 5, os valores médios de HCH total e DDT obtidos para o grupo exposto foram significativamente maiores do que os do grupo controle. A comparação desses dados com aqueles da Tabela 15, que contém os parâmetros para o controle de exposição a organoclorados estabelecidos pela legislação brasileira, confirma a persistência desses compostos no organismo humano em indivíduos expostos. Além disso, sugere a necessidade do uso de equipamento de prote-

ção e a importância da dosagem periódica dos níveis de pesticidas no plasma desses trabalhadores (Minelli, 1993).

No presente estudo, foi realizada a extração de DNA a partir de lâminas arquivadas de preparações citogenéticas. Para que a obtenção de DNA dessas lâminas fosse possível, foram adaptadas técnicas descritas na literatura (Jonveaux, 1991; Melo *et al.*, 1992), o que permitiu a retirada do material antigo, fixado e submetido ou não à coloração com Giemsa (Nunes *et al.*, 1995). Embora tais características representassem uma dificuldade na obtenção de DNA de boa qualidade, a amostra era rica em dados citogenéticos, bioquímicos e clínicos. Esse fato motivou sua utilização, pois os dados moleculares poderiam auxiliar no entendimento dos possíveis efeitos dos pesticidas e na investigação de um biomarcador em populações expostas.

Durante os testes iniciais, algumas condições mostraram-se mais eficientes que outras. Assim, o aumento na concentração de SDS no tampão e o tempo prolongado de atuação da proteinase K revelou-se satisfatório para a extração do DNA. Isso provavelmente foi importante em virtude da qualidade do material disponível, que foi submetido a fixação e coloração e esteve arquivado por vários anos à temperatura ambiente. Realmente, O'Leary *et al.* (1994) referem a necessidade de passos extensos do tratamento proteolítico com a finalidade de indução da dissociação de possíveis ligações cruzadas entre DNA e histonas, decorrentes do processamento inicial do tecido. Segundo esses autores, o mesmo poderia ser obtido com elevação da concentração de cloreto de magnésio durante a PCR. Realmente, essas condições melhoraram a taxa de amplificação neste trabalho.

O'Leary *et al.* (1994) avaliaram tipos diferentes de fixadores, além do tempo e da temperatura do processo e sua influência na conservação do material genético. Suas principais conclusões referiram melhores resultados com a utilização de formaldeído tamponado e solução de Carnoy em temperaturas de 20 a 37° C por tempos variáveis de 24 a 48 horas. Isso provavelmente ocorre porque o formaldeído, nessa temperatura, normalmente não reage com o DNA e o RNA e os fixadores à base de etanol ou metanol, como o Carnoy, preservam o DNA e as histonas.

No caso de preparações citogenéticas após cultivo celular, como aquelas presentemente utilizadas, os fixadores consistem de soluções de metanol acético. O propósito dessa fixação é manter os cromossomos em um estágio específico do ciclo celular com pouca distorção dos detalhes morfológicos, exceto pela sua maior condensação. Como já citado, o álcool aparentemente preserva o DNA. O ácido acético, por sua vez, é uma pequena molécula com excelente penetrabilidade, que precipita as nucleoproteínas e extrai quantidades consideráveis de proteínas cromossômicas. Seu maior efeito adverso é a despurinação e a quebra do DNA, tornando-o mais susceptível à digestão enzimática, bem como a degradação resultante do envelhecimento do material em lâminas (Hagag & Viola, 1993). Efeito semelhante pode ocorrer em consequência do

tratamento com ácido clorídrico durante a coloração de células cultivadas (Holmquist, 1979). Embora difíceis de ser quantificados, esses fatores provavelmente contribuíram para as dificuldades encontradas na amplificação das amostras analisadas.

Segundo Greer *et al.* (1991), os tecidos processados com acetona ou formalina tamponada tendem a mostrar fragmentos de ácidos nucléicos maiores do que aqueles tratados com agentes ácidos. Um fato interessante foi observado por Mezzanotte *et al.* (1988) em relação ao DNA isolado de preparações citogenéticas dispostas em lâminas ou mantidas em tubos, antes e após fixação com metanol e ácido acético. O material tanto em tubos quanto em lâminas de até 12 horas não apresentou diminuição no tamanho dos fragmentos, o que não ocorreu em lâminas mais antigas. Isso indica que a exposição do material nessa última situação provavelmente aumenta a superfície de ação do oxigênio e de outros agentes e, por isso, gera um acentuado processo de degradação. Realmente, Matsuo *et al.* (1995) refere o efeito negativo do oxigênio atmosférico sobre a preservação do DNA de material seco.

Além dos problemas citados, a fixação e a coloração deixam resíduos no material, que contêm componentes inibidores da reação de PCR ou atuam desfavoravelmente na destruição celular, resultando em quantidade menor de DNA disponível (de Roda Husman *et al.*, 1995). Segundo Verma & Babu (1995), o nível de cátions divalentes é crítico à atividade da *Taq* DNA polimerase e a concentração ótima requerida é baixa. Em consequência, altas concentrações de agentes quelantes que retiram esses íons, como o EDTA, e de grupos iônicos negativos podem reduzir a eficiência da reação.

No presente trabalho, para detecção de mutações no protooncogene *NRAS*, foram utilizadas duas metodologias após a amplificação dos segmentos de DNA por PCR, a técnica de SSCP e a hibridação alelo-específica. A primeira foi empregada na triagem dos fragmentos contendo os códons 12 e 13, enquanto que a hibridação por oligonucleotídeos alelo-específicos permitiu a análise dos fragmentos portadores do códon 61. Esses códons constituem pontos importantes na ativação dos protooncogenes da família *RAS* porque levam a trocas de aminoácidos que são fundamentais para a regulação da atividade de GTPase intrínseca da proteína ou para a interação com o nucleotídeo (Saez *et al.*, 1994).

A técnica de SSCP descrita por Orita *et al.* (1989) é simples, rápida e satisfatória no rastreamento de mutações. O seu princípio consiste no fato de que a mobilidade eletroforética de uma partícula em um gel é dependente de sua forma e tamanho. Sob condições não desnaturantes, o DNA em conformação de fita simples possui uma estrutura determinada por interações intramoleculares e por sua sequência. Alterações nessa estrutura podem ser detectadas graças a modificação na sua mobilidade eletroforética em gel de poliacrilamida (que apresenta alto poder de resolução) aliada à vantagem dada pela capacidade de rastreamento da técnica, que permite detectar 90% das alterações na sequência do fragmento estudado (Medeiros, comunicação pessoal; Rodriguez, 1995). A

adaptação da metodologia, com coloração por nitrato de prata no lugar de radioatividade para evidenciar os fragmentos, possibilitou a otimização de sua aplicabilidade.

A técnica de SSCP, entretanto, apresenta limitações com relação ao comprimento do segmento analisado, sendo efetiva em uma faixa entre 200 e 400 pb, na qual pode detectar até 83% das alterações. Quando realizada com fragmentos de pequeno comprimento é relativamente maior a sua confiabilidade (Rodriguez, 1995; van Elsas *et al.*, 1995). Segundo van Elsas *et al.* (1995), a sensibilidade da técnica aumenta muito quando são empregados métodos eficientes de purificação de DNA, utilizando colunas de sílica, por exemplo.

Nos casos estudados, a técnica de SSCP, escolhida pela sua facilidade de aplicação e rapidez, foi capaz de reconhecer com clareza as alterações de migração eletroforética nos códons 12 e 13, uma vez que os fragmentos analisados possuíam cerca de 118 pb. Como os dois pares de **primers** utilizados codificam apenas a região desses códons, pode-se excluir que os dados obtidos sejam referentes a mutações no códon 61, também estudado.

Em relação à técnica de hibridação alelo-específica, que apresenta sensibilidade acentuada em relação ao SSCP, seu princípio reside no fato de que um nucleotídeo com uma única base discordante apresenta uma ligação mais fraca ao DNA complementar do que um nucleotídeo sem nenhuma alteração. A detecção de mutações é possível graças aos procedimentos de hibridação e posteriores lavagens em temperaturas ao redor da temperatura de dissociação do oligonucleotídeo, o que remove todos os fragmentos, exceto aqueles perfeitamente complementares (van Mansfeld & Bos, 1992). O método tem sensibilidade suficiente para detectar a presença de uma célula mutante em dez células normais, embora seja frequentemente utilizado na análise de mutações desconhecidas. Sua desvantagem reside no fato de que a identificação de mutações em ponto está limitada a oligonucleotídeos sintéticos específicos (Radich *et al.*, 1990) e, portanto, aquelas presentes nas proximidades do códon de interesse não são reconhecidas. O mesmo não ocorre na técnica de SSCP, que revela alterações em qualquer ponto do fragmento amplificado.

Apesar da hibridação alelo-específica ter grande especificidade, não foi incomum em nossos resultados, bem como naqueles da literatura consultada (Senn *et al.*, 1988; van Mansfeld & Bos, 1992; Melo, 1994; Tien *et al.*, 1994), a presença de graus variáveis de radiação de fundo ou **background** em algumas amostras. Esse tipo de artefato ocorre ocasionalmente e não oferece dificuldade na diferenciação dos casos positivos. Além disso, como as hibridações foram sempre realizadas mais de uma vez, tais resultados puderam ser confirmados após elevação na temperatura e aumento no tempo de lavagem, o que resulta no desaparecimento ou redução significativa do **background**.

A principal limitação técnica do presente trabalho consistiu na dificuldade de análise de todas as variáveis envolvidas frente à quantidade disponível de material extraído.

Isso ocorreu porque o número de lâminas com preparações cromossômicas era limitado e a extração teve que ser realizada diversas vezes até que os resultados na obtenção de DNA fossem satisfatórios. Como tratava-se de material que permaneceu fixado durante um longo período, além de ter sido manipulado para a análise citogenética, algumas amostras ofereciam resistência à amplificação, sendo necessária a repetição dos procedimentos por várias vezes. Isso limitou bastante a quantidade e a qualidade de material disponível para sequenciamento direto, que visava a identificação e a confirmação das mutações.

Realmente, o sequenciamento direto é um método eficaz na confirmação de resultados obtidos por outras metodologias, como o SSCP ou a hibridação com oligonucleotídeos específicos. Melo (1994), por exemplo, confirmou por essa técnica mutações no oncogene NRAS em pacientes com leucemias agudas detectadas inicialmente por hibridação com oligonucleotídeos alelo-específicos. Entretanto, o sequenciamento direto também tem desvantagens, pois não é capaz de reconhecer mutações em ponto presentes em porcentagens pequenas na amostra (Cogswell *et al.*, 1989; Abo *et al.*, 1993).

No presente estudo, foram realizadas várias tentativas, sem resultado, para sequenciar as amostras que apresentaram suspeita de mutação. Para tanto, foram empregados diversos métodos, incluindo a clonagem do produto de PCR. De fato, a confirmação das alterações detectadas por SSCP nos fragmentos contendo os códons 12 e 13 seria importante pois indicaria o sucesso pleno da técnica desenvolvida. Entretanto, como citado anteriormente, a quantidade e a qualidade de material disponível foi limitante para que esse objetivo fosse alcançado.

Um outro problema que provavelmente afetou os procedimentos de clonagem para o sequenciamento das amostras foi a degradação dos produtos de PCR, previamente observada durante a análise por SSCP. O uso da PCR para metodologias de detecções mais sensíveis, como subclonagem, é complicado pelo fato do produto da amplificação servir como substrato para a geração de mais produtos (Kwok & Higuchi, 1989). O problema com esse procedimento é que os erros se acumulam de modo que diversos produtos de PCR clonados devem ser sequenciados de modo a obter um consenso que reflita a mutação na sequência genômica original e não as mutações ao acaso, introduzidas pela polimerase durante o processo de amplificação (Pingoud, 1993).

Dos 48 casos estudados, 16 apresentaram alterações no protooncogene NRAS. Desses, seis pertenciam ao grupo controle e dez ao grupo de indivíduos expostos. Foram encontrados 11 casos com alterações no fragmento contendo os códons 12 e 13 e cinco no códon 61. Um dos indivíduos do grupo exposto (ANF8) apresentou suspeita de mutação nos dois fragmentos analisados (Tabela 15).

Entre os casos que apresentaram indicação de mutação, destacados nas Tabelas 3 e 5, os níveis de pesticidas organoclorados encontrados no plasma foi maior no grupo

exposto que no controle. Esses níveis podem ser comparados com os parâmetros para o controle de exposição a pesticidas organoclorados estabelecidos pela legislação brasileira apresentados na Tabela 15. É interessante que os dois controles que apresentaram alteração no códon 61 do gene NRAS referiram uso esporádico ou acidente com pesticida.

Indivíduos expostos a compostos usados no combate a pragas têm revelado danos cromossômicos substanciais nos linfócitos, sem indicação de aumento basal de troca entre cromátides irmãs (TCI) (Carbonell *et al.*, 1993). Tais danos parecem ser aditivos, aumentando com a duração da exposição. Fatores adicionais, como hábito de fumar e idade, quando considerados, aumentam significativamente a expressão de TCI mas não das aberrações cromossômicas.

Hashimoto (1990) não detectou efeito clastogênico aditivo do consumo de cigarros nos indivíduos expostos a pesticidas da presente amostra. No entanto, este estudo molecular verificou que a estimativa de risco relativo de mutação foi 41% maior para os aplicadores fumantes que para os controles não-fumantes. O risco relativo, segundo Paula (1982), é uma medida muito comum em epidemiologia, sendo definido como a razão entre a proporção das pessoas com uma característica específica e uma determinada doença ou sinal e a proporção das pessoas sem a mesma característica que também possuem aquela doença ou sinal. Quando o risco relativo foi calculado considerando-se a frequência de mutações em aplicadores e controles não fumantes, o valor obtido também foi elevado (56%). Isto significa que o efeito dos pesticidas em si aumenta a probabilidade de mutação. Aparentemente o fumo também é um fator relacionado a esse aumento no grupo controle fumante, embora o mesmo não tenha sido observado entre os aplicadores. Esse resultado não surpreende porque já é bem conhecido o fato de que mutações do proto-oncogene KRAS estão relacionadas ao hábito de fumar, especialmente em indivíduos com adenocarcinomas de pulmão (Slebos *et al.*, 1991; Rodenhuis & Slebos, 1992; Westra *et al.*, 1993a, b). Não apenas esse gene mas outros oncogenes, além da expressão alterada de fatores de crescimento e da inativação de genes supressores de tumor, também são observadas em portadores de neoplasias de pulmão associadas a tabagismo (Rusch & Dmitrovsky, 1995), o que reforça o conhecido papel do fumo como agente mutagênico.

Em relação à idade, é fato estabelecido na literatura que o processo carcinogênico é uma consequência naturalmente relacionada com o envelhecimento, principalmente em virtude da exposição a diferentes agentes ao longo da vida e das alterações provocadas no material genético (Riggs, 1994). Dado que a idade média do grupo exposto e controle foi de 52,5 anos e 49, respectivamente, com tempo de exposição ocupacional de 24,4 anos entre os primeiros, é possível que a presença de mutações em alguns deles esteja relacionada com esse fator. Não pode ser esquecido o fato, já citado pela literatura, de que linfócitos T citotóxicos reconhecem a proteína Ras mutante e, portanto, são competentes para desencadear uma reação imune e para levar células portadoras à lise

(Fossum *et al.*, 1994). Embora difícil de ser confirmada, a ausência desse tipo de resposta, provavelmente também relacionada com o fator idade, não pode ser descartada entre os indivíduos estudados.

As indicações de mutação encontradas por hibridação com oligonucleotídeos alelo-específicos foram quatro transições A→G na segunda posição do códon 61, com substituição de glicina por arginina, e uma transição A→T na terceira posição, com substituição de glicina por histidina. Essas alterações foram detectadas em três indivíduos do grupo de aplicadores e em dois do grupo controle, três deles fumantes e um com relato de acidente com pesticida. Entre os primeiros, o agente causal pode realmente ter sido a exposição a pesticidas. Entretanto, a explicação do resultado entre os controles é difícil de ser feita. O fumo e o uso esporádico desses compostos não podem ser excluídos nessa explicação, embora qualquer argumento usado será acompanhado da imprecisão da informação fornecida. Outros agentes possíveis são aqueles inerentes à profissão e a outras atividades desenvolvidas que, apesar de aparentemente não associadas a fatores mutagênicos, podem resultar na permanência em ambientes com compostos genotóxicos.

Os participantes do grupo controle negam qualquer exposição ocupacional a agentes químicos, possuem local definido de trabalho, geralmente em salas ou na sede de suas instituições. Nas entrevistas com alguns dos que apresentaram mutação, no entanto, pôde ser verificado que as atividades profissionais ocultam uma certa exposição a determinados agentes como, por exemplo, derivados de petróleo e gases tóxicos em garagens (garagista - CF3; motorista - CNF8), drogas (almoxarife - CNF11) ou mesmo material biológico e drogas (auxiliar de laboratório - CNF4), exposição essa difícil de ser quantificada.

Relatos sobre freqüências de mutações nos genes da família RAS em indivíduos normais não são comuns. Yakubovskaya *et al.* (1995) referem formas mutantes do KRAS em 10 a 13% de pacientes analisados sem qualquer indício de doenças oncológicas. Entretanto, os autores não excluem a possibilidade de que alguns desses casos positivos na verdade refletem alterações por exposição a carcinógenos ou são resultantes de eventos endógenos decorrentes de defeitos no sistema de reparo do DNA ou de enzimas de metabolização de compostos tóxicos. De qualquer modo, salientam que a presença de alelos mutantes RAS implicam em ação de substâncias mutagênicas e requerem análise de diferentes biomarcadores bem como de seguimento clínico dos portadores.

Ao contrário do observado em indivíduos normais, mutações RAS em ponto têm sido freqüentemente descritas em síndromes mielodisplásicas (Hirai *et al.*, 1987; Liu *et al.*, 1987), em leucemia mielóide aguda (LMA) e LLA, doenças essas muitas vezes associada com o uso de pesticidas (Janicki, 1972; Sandler & Collman, 1987; Brown *et al.*, 1990; Chuang & Chuang, 1991; Crane & Keating, 1991; Cuneo *et al.*, 1992; Fagioli *et al.*, 1992; Richardson *et al.*, 1992). Aproximadamente 90% delas envolvem o gene NRAS (Radich *et al.*, 1990), sendo as mais comuns nos códons 12 e 13 (Bos *et al.*, 1985; Farr *et*

al., 1988; Radich *et al.*, 1990; Tien *et al.*, 1994), e um pouco menos no códon 61. Outros segmentos também estão envolvidos, como os códons 8, 11, 15, 16, 59, 63, 116 e 119 (Ahuja *et al.*, 1990). Segundo Tien *et al.* (1994), tais alterações estão correlacionadas a uma sobrevida reduzida e uma alta frequência na transformação aguda em pacientes com síndrome mielodisplásica, especialmente aquelas que atingem o gene NRAS.

Inokuchi *et al.* (1991) verificaram, analisando por **dot-blot** os códons 12, 13 e 61 em pacientes com síndrome mielodisplásica, que foram freqüentes a ativação do N e do KRAS. Em dois dos indivíduos analisados, essas mutações ocorreram simultaneamente. Outras alterações também foram observadas, em especial a perda de heterozigotidade para alelos específicos do cromossomo 7, que possivelmente desempenham um papel importante no desenvolvimento de leucemias.

De maneira geral, as transições G→A são muito observadas em todos os genes RAS (Senn *et al.*, 1988; Farr *et al.*, 1988; Radich *et al.*, 1990; Tien *et al.*, 1994), e têm sido consideradas como uma possível característica de vantagem seletiva para a manutenção do fenótipo transformante. Sabe-se que essas alterações no NRAS parecem influenciar o padrão de expressão das citocinas IL-1 α , IL-6 e do fator de necrose tumoral TNF α , resultando em vantagens de crescimento em algumas células tumorais. Como os promotores de genes de dois desses fatores (IL-6 e TNF2) contêm sítios de ligação para o complexo AP1 e que a atividade do FOS e do JUN é aumentada pelos genes RAS mutantes, é possível que a substituição glicina → arginina na posição 61 leve à expressão alterada de AP-1 e, conseqüentemente influencie o processo de tumorigênese via citocinas (Castelli *et al.*, 1994). É interessante que um dos sinais desencadeados por IL-6, um dos principais fatores envolvidos na diferenciação do linfócito B, consiste na fosforilação da proteína do gene PIK3R1 (GRB-2) que, por sua vez tem um importante papel na ativação da Ras (Voet & Voet, 1995). No presente estudo, o fato inverso, com transições A→G, foi mais freqüente no códon 61, pois quatro dos cinco casos detectados apresentaram essa característica.

Existem relatos em camundongos e no homem de que a expressão elevada no NRAS não acompanhada por modificação estrutural leva à tumorigênese (Mangues *et al.*, 1994). Uma análise desse aspecto não foi objetivo do presente trabalho, mas poderia trazer esclarecimentos sobre os padrões moleculares envolvidos na ação dos organoclorados e de outros pesticidas.

Ensaio com animais ou utilizando a introdução de genes em células cultivadas têm revelado que os oncogenes RAS mutados não são suficientes para induzir a tumorigênese por si só em diferentes tecidos, inclusive o hematopoético (Goldfarb, 1987; Ahuja *et al.*, 1990; Kumar *et al.*, 1990; Sabbatini *et al.*, 1994; Giunciuglio *et al.*, 1995). A mesma conclusão já foi obtida em análises de neoplasias pré-malignas, que indicam a ocorrência de mutações RAS em estágios de iniciação da carcinogênese, por ocasião da interação direta entre o carcinógeno e o gene-alvo (Balmain & Brown, 1988).

Sabe-se que a maioria dos carcinógenos químicos não é reativa por si só. São na verdade pró-carcinógenos e, antes de tornarem-se tóxicos, devem passar por algumas transformações metabólicas, coordenadas por sistemas enzimáticos sob controle genético. Devido a esse sistema de defesa, sofrem *in vivo* um processo mais ou menos sofisticado, que geralmente envolve pelo menos duas fases: a ativação e, a seguir, a conjugação, que resultará na eliminação das moléculas processadas (Tredaniel *et al.*, 1995). Como tais etapas dependem de enzimas controladas geneticamente, são esperadas diferenças na susceptibilidade ao desenvolvimento do câncer. Considerando que tais enzimas não são eficientes em certos indivíduos na eliminação de um determinado agente químico, alterações genéticas desencadeadas por esse agente em pontos críticos do genoma podem ocorrer. Se elas não forem reparadas, a célula é dita iniciada no processo da carcinogênese (Pitot, 1993).

O estágio da iniciação tem sido estudado detalhadamente em poucos sistemas. A razão está na incapacidade de identificar, isolar e caracterizar especificamente as células envolvidas. Parece que a maioria das células iniciadas nunca continua através dos estágios subsequentes, permanecendo quiescentes no organismo. Assim, não é improvável que organismos adultos possuam numerosas células iniciadas na maioria dos órgãos, caracterizando o primeiro estágio no desenvolvimento do câncer como extremamente comum (Pitot, 1993). Isso pode explicar o fato de que os indivíduos estudados, embora apresentando mutações do NRAS, não tenham desenvolvido neoplasias e manifestem boas condições de saúde.

A epidemiologia molecular permite o progresso no conhecimento da carcinogênese química e tem avançado no desenvolvimento de metodologias para estimar a dose biologicamente efetiva, ou seja, a quantidade ou a concentração do xenobiótico ativo disponível nos alvos críticos. De modo semelhante, avanços substanciais foram obtidos na metodologia para estabelecer efeitos biológicos precoces que resultam em células iniciadas (Poulsen & Loft, 1995). No presente trabalho, os resultados obtidos sugerem que a ativação do NRAS deve ser um processo complexo e dependente de muitas variáveis e que a exposição ocupacional a pesticidas pode ser responsável por esse evento, embora não seja descartada a hipótese de que outros fatores, como o fumo, influenciem no seu aparecimento. A relação ativação RAS-pesticidas, portanto, não é direta e simples e certamente outros estudos devem ser conduzidos para que a relevância de mutações nesse gene como indicador de efeito de exposição a pesticidas seja estabelecida.

Os resultados mostraram também que a utilização de material arquivado, embora apresente muitas dificuldades adicionais em relação ao seu equivalente fresco, pode ser um instrumento importante na análise de possíveis marcadores da atuação de compostos sobre os tecidos ou mesmo de doenças como o câncer, fornecendo uma alternativa valiosa quando o material fresco correspondente não está disponível.



O presente estudo teve as seguintes conclusões:

1. É possível o emprego de uma metodologia própria para extração e análise de salina e cânceres para a partir de lâminas de preparações citogenéticas. Essa metodologia constitui um método valioso para análise de células arquivadas pós-cultura e, portanto, para o aproveitamento de espécimes geralmente não utilizados após a análise citogenética convencional. Possibilita também a análise de amostras cujas lâminas representam o único material biológico disponível para estudo.

2. Com a técnica utilizada, a frequência observada de mutações no protooncogene NRAS em indivíduos expostos cronicamente a pesticidas não diferiu significativamente da observada para o grupo controle.

3. A comparação entre os indivíduos fumantes expostos e não fumantes do grupo controle mostrou um risco relativo dessa mutação 41% maior entre os primeiros. Riscos relativos mais altos também foram detectados em controles fumantes quando comparados aos não fumantes.

4. Os resultados mostraram que, além dos pesticidas, o fumo, a idade e as condições de trabalho participam na indução de alterações do gene NRAS.

5. Os resultados, embora preliminares, indicam que outros estudos devem ser conduzidos para que a relevância das mutações no protooncogene NRAS como marcador de efeito de exposição a pesticidas possa ser estabelecida.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

O presente estudo teve as seguintes conclusões:

1. É possível o emprego de uma metodologia própria para extração e análise de DNA a partir de lâminas de preparações citogenéticas. Essa metodologia constitui um método valioso para estudo de células arquivadas pós-cultivo e, conseqüentemente, para o aproveitamento de espécimes geralmente não utilizados após a análise citogenética convencional. Possibilita também a análise de amostras cujas lâminas representam o único material biológico disponível para estudo.

2. Com a técnica utilizada, a freqüência observada de mutações no protooncogene NRAS em indivíduos expostos cronicamente a pesticidas não diferiu significativamente da observada para o grupo controle.

3. A comparação entre os indivíduos fumantes expostos e não fumantes do grupo controle mostrou um risco relativo dessa mutação 41% maior entre os primeiros. Riscos relativos mais altos também foram detectados em controles fumantes quando comparados aos não fumantes.

4. Os resultados mostraram que, além dos pesticidas, o fumo, a idade e as condições no ambiente de trabalho podem participar na indução de alterações do gene NRAS.

5. Os resultados, embora preliminares, indicam que outros estudos devem ser conduzidos para que a relevância das mutações no protooncogene NRAS como marcador de efeito de exposição a pesticidas possa ser estabelecido.

RESUMO

O desenvolvimento de técnicas de diagnóstico é essencial para a identificação de alterações genéticas. A presença de alterações genéticas pode representar a ocorrência de alterações na sequência de nucleotídeos e, portanto, a presença de alterações na sequência de aminoácidos. A presença de alterações genéticas pode representar a ocorrência de alterações na sequência de nucleotídeos e, portanto, a presença de alterações na sequência de aminoácidos.

A presença de alterações genéticas pode representar a ocorrência de alterações na sequência de nucleotídeos e, portanto, a presença de alterações na sequência de aminoácidos. A presença de alterações genéticas pode representar a ocorrência de alterações na sequência de nucleotídeos e, portanto, a presença de alterações na sequência de aminoácidos.

O propósito do presente trabalho foi desenvolver uma metodologia para análise de DNA de preparatos citogenéticos. A análise de DNA de preparatos citogenéticos foi realizada por meio de técnicas de PCR e SSCP. A análise de DNA de preparatos citogenéticos foi realizada por meio de técnicas de PCR e SSCP.

As amostras de DNA foram analisadas por PCR e SSCP. A análise de DNA de preparatos citogenéticos foi realizada por meio de técnicas de PCR e SSCP. A análise de DNA de preparatos citogenéticos foi realizada por meio de técnicas de PCR e SSCP.

Não foram encontradas alterações genéticas nas amostras analisadas. A análise de DNA de preparatos citogenéticos foi realizada por meio de técnicas de PCR e SSCP. A análise de DNA de preparatos citogenéticos foi realizada por meio de técnicas de PCR e SSCP.

As alterações genéticas foram detectadas por meio de técnicas de PCR e SSCP. A análise de DNA de preparatos citogenéticos foi realizada por meio de técnicas de PCR e SSCP. A análise de DNA de preparatos citogenéticos foi realizada por meio de técnicas de PCR e SSCP.

RESUMO

RESUMO

O desenvolvimento do câncer é decorrente do acúmulo de muitas alterações genéticas, que fazem parte da progressão da doença e podem ser utilizadas como biomarcadores importantes nesse processo. Indivíduos com predisposição hereditária ou riscos ocupacionais de câncer podem, por exemplo, ser avaliados para mutações em genes específicos associados com essa susceptibilidade ou com a ação de carcinógenos.

A presença de certos marcadores pode representar a ocorrência de alterações precoces do processo maligno ou da sua progressão, bem como fornecer informações valiosas sobre o prognóstico da doença. No futuro, a seleção desses marcadores e a aplicação de técnicas adequadas poderá ser utilizada em populações alvo, fornecendo dados sobre os riscos aos quais elas estão expostas. Nesse aspecto, espécimes arquivados são importantes para análise, pois permitem correlações entre determinadas mutações e o desenvolvimento de certos tipos de neoplasias.

O propósito do presente estudo foi desenvolver uma metodologia para extrair e analisar DNA de preparações citogenéticas arquivadas de um grupo de 28 desinsetizadores e 20 controles não expostos a pesticidas. A disponibilidade desse material e as evidências do potencial carcinogênico dos pesticidas motivou o presente trabalho, que também teve como objetivo investigar a presença de um biomarcador de risco ambiental, as mutações no gene NRAS.

As amostras de DNA foram analisadas pela técnica de PCR - SSCP e por hibridação com oligonucleotídeos alelo-específicos. Dos 48 casos estudados, 16 apresentaram mutações no gene NRAS. Desses, seis pertenciam ao grupo controle e dez ao grupo de indivíduos expostos. Foram encontrados 11 casos com mutações no fragmento contendo os códons 12 e 13 e cinco com mutações no códon 61. Um dos indivíduos do grupo exposto apresentou mutações nos dois fragmentos analisados.

Não foram encontrados indícios de que a proporção de mutações entre os indivíduos expostos a pesticidas fosse maior do que a observada entre os não expostos. Na comparação entre os fumantes e não fumantes pertencentes aos dois grupos e que eram portadores de mutação, foi verificado um risco relativo de mutação 41% maior para os aplicadores fumantes em relação aos controles não fumantes. Riscos relativos mais altos também foram detectados em controles fumantes quando comparados aos não fumantes.

As conclusões obtidas são preliminares e indicam a necessidade de outros estudos para melhor avaliação da relevância das mutações no protooncogene NRAS como marcador de exposição ocupacional a pesticidas. De qualquer modo, a técnica presentemente desenvolvida para preparações citogenéticas arquivadas mostrou-se um instrumento valioso para análises moleculares retrospectivas.



Neoplasms arise and progress through the accumulation of various genetic changes. Since these alterations are an intimate part of cancer progression, they can serve as useful markers of this disease. Individuals with inherited predisposition or significant environmental risk can be evaluated by testing genetic mutations at specific genes associated with cancer susceptibility or carcinogens. The presence of certain markers may represent early genetic changes in malignancy or even alterations associated to late progression steps. As tumors grow, a variety of them may provide valuable information related to clinical outcome.

In the years ahead, the selection of appropriate markers and the application of correct technology may be used for targeted populations and will enable us to assess the risks involved.

In this respect, archival clinical specimens are valuable to analyze such markers because they allow to make correlations between mutations and the development of malignancy.

The purpose of the present study was to develop a procedure to extract DNA suitable for PCR from archived cytogenetic preparations of a group of 28 pesticide applicators and 20 non occupationally-exposed individuals. The availability of this material and evidence of the pesticides carcinogenic potential has motivated this research, which also objectives to investigate the presence of a biomarker of environmental risk, the mutations in NRAS gene.

The samples of DNA have been analyzed by PCR-SSCP and by allele-specific oligonucleotides (ASO). From the 48 studied cases, 16 had presented mutations in NRAS proto-oncogene. From these, 8 are controls and 8 are exposed. Were found 11 cases with mutations at codons 12, 13 and five at codon 61. An exposed individual has mutations in the two analysed segments.

There were not found evidences that the exposed group would have an increase on the mutation rate. When comparing non-smoking controls to smoking pesticide applicators, it was observed a relative risk of mutation 41% higher in the second one. Higher relative risks were also detected in smoking than in non-smoking controls.

The conclusions are preliminary and indicate the need of other studies to improve the evaluation of the NRAS proto-oncogenes importance as a marker of occupational exposure to pesticides. However, the technique presently developed for archived cytogenetic preparations proved to be a valuable tool for molecular retrospective analysis.

SUMMARY

SUMMARY

Neoplasms arise and progress through the accumulation of various genetic changes. Since these alterations are in intimate part of cancer progression, they can serve as useful markers of this disease. Individuals with inherited predisposition or significant environmental risk can be evaluated by testing genetic mutations at specific genes associated with cancer susceptibility or carcinogens. The presence of certain markers may represent early genetic changes in malignancy or even alterations associated to progression steps. As tumors grow, a variety of them may provide valuable information related to clinical outcome.

In the years ahead, the selection of appropriated markers and the application of correct technology may be used for targeted populations and will enable us to assess the risks involved.

In this respect, archival clinical specimens are valuable to analyze such markers because they allow to make correlations between mutations and the development of malignancy.

The purpose of the present study was to develop a procedure to extract DNA suitable for PCR from archived cytogenetic preparations of a group of 28 pesticide appliers and 20 non occupationally-exposed individuals. The availability of this material and evidences of the pesticides carcinogenic potential has motivated this research, which also objectived to investigate the presence of a biomarker of environmental risk, the mutations in NRAS gene.

The samples of DNA have been analysed by PCR-SSCP and by allelic-specific oligonucleotides (ASO). From the 48 studied cases, 16 had presented mutations in NRAS proto-oncogene. From these, 6 are controls and 10 are exposed. Were found 11 cases with mutations at codons 12, 13 and five at codon 61. An exposed individual had mutations in the two analysed segments.

There were not found evidences that the exposed group would have an increase on the mutation rate. When comparing nonsmoking controls to smoking pesticide appliers, it was observed a relative risk of mutation 41% higher in the second one. Higher relative risks were also detected in smoking than in nonsmoking controls.

The conclusions are preliminar and indicate the need of other studies to improve the evaluation of the NRAS proto-oncogenes importance as a marker of occupational exposure to pesticides. However, the technique presently developed for archived cytogenetic preparations proved to be a valuable tool for molecular retrospective analysis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABO, J., INOKUCHI, K., QIAN, K., NOMURA, T. p53 and *N-ras* mutations in two new leukemia cell lines established from a patient with multilineage CD7 - positive acute leukemia. *Blood*, v. 82, n. 8, p. 2629-35, 1993.
- ANUJA, H.G., FOTI, A., SAR-ELI, M., CLINE, M.J. The pattern of mutational involvement of *RAS* genes in human hematologic malignancies determined by DNA amplification and direct sequencing. *Blood*, v. 75, n. 8, p. 1884-90, 1990.
- AMSTAD, P.A. & CERUTTI, P.A. Ultraviolet-B-light-induced mutagenesis of *C-H-ras* codons 11 and 12 in human skin fibroblasts. *Int. J. Cancer*, v. 63, n. 1, p. 135-8, 1995.
- BALMAIN, A. & BROWN, K. Oncogene activation in chemical carcinogenesis. *Adv. Cancer Res.*, v. 61, p.147-82, 1988.
- BALMAIN, A., RAMSDEN, M., BOWDEN, G.T., SMITH, J. Activation of the mouse cellular Harvey-*ras* gene in chemically induced benign skin papillomas. *Nature*, v. 307, p. 658, 1984.
- BASHEY, A., GILL, R., LEV, S., FARR, C.J., CLUTTERBUCK, R., MILLAR, J.L., PRADNELL, I.B., MARSHALL, C.J. pleiotropic activation of the *N-ras* oncogene assessed in primary clonogenic culture of acute myeloid leukemia (AML): implications for the role of *N-ras* mutation in AML pathogenesis. *Blood*, v. 79, n. 4, p. 981-9, 1992.
- BASU, T., WARNE, P.H., DOWNWARD, J. Role of Shc in the activation of Ras in response to epidermal growth factor and nerve growth factor. *Oncogene*, v. 9, n. 12, p. 3483-91, 1994.
- BISHOP, Y.M.M., FRIEDBERG, W.E., HOLLAND, P.W. *Discrete Multivariate Analysis: Theory and Practice*. MIT Press, Massachusetts, 557p., 1984.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BLAIR, A.

pattern of death among breast cancer patients. *Int. J. Cancer*, v.71, n. 24, 7, 1993.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABO, J., INOKUCHI, K., DAN, K., NOMURA, T. p53 and *N-ras* mutations in two new leukemia cell lines established from a patient with multilineage CD7 - positive acute leukemia. **Blood**, v. 82, n. 9, p. 2829-36, 1993.
- AHUJA, H.G., FOTI, A.; BAR-ELI, M., CLINE, M.J. The pattern of mutational involvement of *RAS* genes in human hematologic malignancies determined by DNA amplification and direct sequencing. **Blood**, v.75, n. 8, p. 1684-90, 1990.
- AMSTAD, P.A. & CERUTTI, P.A. Ultraviolet-B-light-induced mutagenesis of C-H-*ras* codons 11 and 12 In human skin fibroblasts. **Int. J. Cancer**, v. 63, n. 1, p. 136-9, 1995.
- BALMAIN, A. & BROWN, K. Oncogene activation in chemical carcinogenesis. **Adv. Cancer Res.**, v. 51, p.147-82, 1988.
- BALMAIN, A., RAMSDEN, M., BOWDEN, G.T., SMITH, J. Activation of the mouse cellular Harvey-*ras* gene in chemically induced benign skin papillomas. **Nature**, v. 307, p. 658, 1984.
- BASHEY, A., GILL, R., LEVI, S., FARR, C.J., CLUTTERBUCK, R., MILLAR, J.L., PRAGNELL, I.B., MARSHALL, C.J. Mutational activation of the *N ras* oncogene assessed in primary clonogenic culture of acute myeloid leukemia (AML): implications for the role of *N ras* mutation in AML pathogenesis. **Blood**, v. 79, n. 4, p. 981-9, 1992.
- BASU, T., WARNE, P.H. DOWNWARD, J. Role of Shc in the activation of Ras In response to epidermal growth factor and nerve growth factor. **Oncogene**, v. 9, n. 12, p. 3483-91, 1994.
- BISHOP, Y.M.M., FIENBERG, S.E., HOLLAND, P.W. **Discrete Multivariate Analysis: Theory and Practice**. MIT Press, Massachusetts, 557p., 1984.
- BLAIR, A., GRAUMAN, D.J., LUBIN, J.H., FRAUMENI, J.F. Lung cancer and other causes of death among licensed pesticide applicators. **J.N.C.I.**, v.71, p. 31-7, 1983.

BOS, J.L., TOKSOZ, D., MARSHALL, C.J., VERLAAN - DE VRIES, M., VEENEMAN, G.H., VAN DER EB, A.J., VAN BOOM, J.H., JANSSEN, J.W.G., STEENVOORDEN, A.C.M. Amino-acid substitutions at codon 13 of the N-ras oncogene in human acute leukaemia. **Nature**, v.315, n.6022, p.726-30, 1985

BOURNE, H.R., SANDERS, D.A., MCCORMICK, F. The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. **Nature**, v. 348, n.6297, p. 125-32, 1990.

BOX, G.E.P., HUNTER, W.G., HUNTER, J.S. **Statistics for experimenters - an introduction to design, data analysis, and model building**. John Wiley & Sons, New York, 1978.

BRENTNALL, T.A., CHEN, R., LEE, J.G., KIMMEY, M.B., BRONNER, M.P., HAGGITT, R.C., KOWDLEY, K.V., HECKER, L.M., BYRD, D.R. Microsatellite instability and K-ras mutations associated with pancreatic adenocarcinoma and pancreatitis. **Cancer Res.**, v. 55, n. 19, p. 4264-7, 1995.

BROUWER, D.H., BROUWER, E.J., VAN HEMMEM, J.J. Estimation of long-term exposure to pesticides. **Am. J. Ind. Med.**, v.25, p. 573-88, 1994.

BROWN, L.M.; BLAIR, A.; GIBSON, R.; EVERETT, G.D.; CANTOR, K.P.; SCHOMAN, L.M.; BURMEISTER, L.F.; VAN LIER, S.F., DICK, F. Pesticide exposures and other agricultural risk factors for leukemia among men in Iowa and Minnesota. **Cancer Res.**, v. 50, p. 6585-91, 1990.

BUCKLEY J.D., ROBISON, L.L., SWOTINSKY, R., GARABRANT, D.H., Le BEAU, M., MANCHESTER, P., NESBIT, M.E., ODON, L., PETERS, J.M., WOODS, W.G., HAMMOND, G.D. Occupational exposures of parents of children with acute nonlymphocytic leukemia: a report from the childrens cancer study group. **Cancer Res.**, v. 49, p. 4030-7, 1989.

CARBONELL, E., XAMENA, N., CREUS, A., MARCOS, R. Cytogenetic biomonitoring in a Spanish group of agricultural workers exposed to pesticides. **Mutagenesis**, v. 8, n.6, p. 511-7, 1993.

CARMICHAEL, N.G. Assessment of hazards to workers applying pesticides. **Food Add. Contam.**, v.6, p. 21-7, 1989.

- CASEY, P.J. Protein lipidation in cell signaling. **Science**, v. 268, n. 5208, p. 221-5, 1995.
- CASTELLI, C., SENSI, M., LUPETTI, R., MORTARINI, R., PANCERI, P., ANICHINI, A., PARMIANI, G. Expression of interleukin 1 α , interleukin 6, and tumor necrosis factor α genes in human melanoma clones is associated with that of mutated N-RAS oncogene. **Cancer Res.**, v. 54, n. 17, p. 4785-90, 1994.
- CERUTTI, P., HUSSAIN, P., POURZAND, C., AGUILAR, F. Mutagenesis of the H-ras protooncogene and the p53 tumor suppressor gene. **Cancer Res.**, v. 54, n. 7(supl.), p. 1934s-8s, 1994.
- CHADWICK, R.W., COPELAND, M.F., WOLFF, G.L., COOKE, N., WHITEHOUSE, D.A., MOLE, M.L. Effects of age and obesity on the metabolism of lindane by black *a/a*, yellow A *vy/a* and pseudoagouti *Avy/a* phenotypes of (YS x VY) F1 Hybrid mice. **J. Toxicol. Environ. Health**, v. 16, p. 771-96, 1985.
- CHIU, R., ANGEL, P., KARIN, M. Jun-B differs in its biological properties from, and is a negative regulator of, c-Jun. **Cell**, v. 59, p.979-86, 1989.
- CHUANG, L.F. & CHUANG, R.Y. The effect of the insecticide heptachlor on *ras* protooncogene expression in human myeloblastic leukemia (ML-1) cells. **Toxicology**, v. 70, p. 283-92, 1991.
- COCHRAN, B.H., REFFEL, A.C., STILES, C.D. Molecular cloning of gene sequences regulated by platelet-derived growth factor. **Cell**, v.33, p. 939-47, 1983.
- COGSWELL, P.C.; MORGAN, R.; DUNN, M.; NEUBAUER, A.; NELSON, P.; POLAND-JOHNSTON, N.K.; SANDBERG, A.A., LIU, E. Mutations of the *ras* protooncogenes in chronic myelogenous leukemia: a high frequency of *ras* mutations in *blr/abl* rearrangement-negative chronic myelogenous leukemia. **Blood**, v. 74, n. 8, p. 2629-2633, 1989.
- CRANE, M.M. & KEATING, M.J. Exposure histories in acute nonlymphocytic leukemia patients with a prior preleukemic condition. **Cancer**, v. 67, p. 2211-4, 1991.
- CROSSEN, P.E., MORGAN, W.F., HORAN, J.J., STEWART, J. Cytogenetic studies of pesticide and herbicide sprayers. **N. Z. Med. J.**, v. 88, p.192-5, 1978.

- CUNEO, A.; FAGIOLI, F.; PAZZI, I.; TALLARICO, A.; PREVIATI, R.; PIVA, N.; CARLI, M.G.; BALBONI, M. & CASTOLDI, G. Morphologic, immunologic and cytogenetic studies in acute myeloid leukemia following occupational exposure to pesticides and organic solvents. **Leukemia Research**, v.16, n. 8, p. 789-796, 1992.
- DALTON, M.B., FANTLE, K.S., BECHTOLD, H.A., DeMAIO, L., EVANS, R.M., KRYSTOSEC, A., SINENSKY, M. The farnesyl protein transferase inhibitor BZA-5B blocks farnesylation of nuclear lamins and p21^{ras} but does not affect their function or localization. **Cancer Res.** v. 55, n. 15, p. 3295-304, 1995.
- DAWSON, T.P., RADULESCU, A., WYNFORD-THOMAS, D. Expression of mutant p21^{ras} induces insulin-like growth factor 1 secretion in thyroid epithelial cells. **Cancer Res.**, v. 55, n. 4, p. 915-20, 1995.
- de RODA HUSMAN, A-M., SNIJDERS, P.J.F., STEL, H.V., van den BRULE, A.J.C., MEIJER, C.J.L.M., WALBOOMERS, J.M.M. Processing of long-stored archival cervical smears for human papillomavirus detection by the polymerase chain reaction. **Brit. J. Cancer**, v.72, p. 412-7, 1995.
- DITRAGLIA, D., BROWN, D.P., NAMEKATA, T., IVERSON, N. Mortality study of workers employed at organochlorine pesticide manufacturing plants. **Scan. J. Work Environ. Health**, v. 7, p. 140-6, 1981.
- DLUGOSZ, A.A., CHENG, C., WILLIAMS, E.K., DHARIA, A.G., DENNING, M.F., YUSPA, S.H. Alterations in murine keratinocyte differentiation induced by activated *ras*^{Ha} genes are mediated by protein kinase C- α . **Cancer Res.**, v. 54, n. 24, p. 6413-20, 1994.
- DOYLE, C.T. & O'LEARY, J.I. The search for the universal fixative or 'magic juice'. **J. Pathol.**, v. 166, p. 331-2, 1992.
- DUISIT, G., GRUNWALD, D., LAWRENCE, J.J. Antioncogènes et cycle cellulaire. **Path. Biol.**, v.41, n.1, p.16, 1993.
- DULOUT, F.N., PASTORI, M.C., OLIVERO, O.A., CID, M.G., LORIA, D., MATOS, E., SOBEL, N., de BUJAN, E.C., ALBIANO, N. Sister-chromatid exchanges and chromosomal aberrations in a population exposed to pesticides. **Mut. Res.**, v. 143, p. 237-44, 1985.

- EL-SHARKAWY, A.M., ABDEL-RAHMAN, S.Z., HASSAN, A.A., GABR, M.H., EL-ZOGHBY, S.M., EL-SEWEDY, S.M. Biochemical effects of some insecticides on the metabolic enzymes regulating glutathione metabolism. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 52, p. 505-10, 1994.
- ERLICH, H.A. (ed.) **PCR technology - Principles and Applications for DNA Amplification.** W.H.Freeman and Co., New York, 1992.
- FAGIOLI, F.; CUNEO, A.; PIVA, N.; CARLI, M.G.; PREVIATI, R.; BALBONI, M.; TOMASI, P.; CARIANI, D.; SCAPOLI, G., CASTOLDI, G. Distinct cytogenetic and clinicopathologic features in acute myeloid leukemia after occupational exposure to pesticides and organic solvents. **Cancer**, v. 70, n. 1, p. 77-85, 1992.
- FARR, C.J., SAIKI, R.K., ERLICH, H.A., MCCORMICK, F., MARSHALL, C.J. Analysis of RAS gene mutation in acute myeloid leukemia by polymerase chain reaction and oligonucleotide probes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 85, n. 5, p. 1629-33, 1988.
- FARROW, A., JACOBS, A., WEST, R.R. Myelodysplasia, chemical exposure, and other environmental factors. **Leukemia**, v. 3, p.33-5, 1989.
- FILMUS, J., ROBLES, A.I., SHI, W., WONG, M.J., COLOMBO, L.L., CONTI, C.J. Induction of cyclin D1 overexpression by activated *ras*. **Oncogene**, v. 9, n. 12, p. 3627-33, 1994.
- FISHER, R.A. **Statistical methods for research workers.** Oliver & Boyd (eds.). Edinburg, 1934.
- FLODIN, U., FRIEDRIKSON, M., PERSSON, B., AXELSON, O. Chronic lymphatic leukaemia and engine exhausts, fresh wood, and DDT: a case-referent study. **Brit. J. Ind. Med.**, v. 45, p. 33-8, 1988.
- FOSSUM, B., GEDDE-DAHL III, T., BREIVIK, J., ERIKSEN, J.A., SPURKLAND, A., THORSBY, E., GAUDERNACK, G. p21-ras-peptide-specific T-cell responses in a patient with colorectal cancer. CD4⁺ and CD8⁺ T cells recognize a peptide corresponding to a common mutation (13 Gly→Asp). **Int. J. Cancer**, v. 56, n.1, p. 40-5, 1994.
- FOX, P. L.; SA, G., DOBROWOLSKY, S.F., STACEY, D.W. The regulation of endothelial cell motility by p21 *ras*. **Oncogene**, v. 9, n. 12, p. 3519-26, 1994.

- GIUNCIUGLIO, D., CULTY, M., FASSINA, G., MASIELLO, L., MELCHIORI, A., PAGLIOLUNGA, G., ARAND, G., CIARDIELLO, F., BASOLO, F., THOMPSON, E.W., ALBINI, A. Invasive phenotype of MCF10A cells overexpressing c-Ha-ras and c-erbB-2 oncogenes. **Int. J. Cancer**, v. 63, n. 6, p. 815-22, 1995.
- GODON, D., THOUEZ, J-P., LAJOIE, P., NADEAU, D. Incidence of cancers of the brain, the lymphatic tissues, and of leukemia and the use of pesticides among Quebec's rural farm population, 1982-1983. **Geogr. Med.**, v. 14, p. 213-32, 1989.
- GODON, D., LAJOIE, P., THOUEZ, J-P. Mortalité par cancers du cerveau, des tissus lymphatiques et la leucémie selon l'utilisation des pesticides, en agriculture, au Québec (1976-1985). **Rev. Can. Sant. Pub.**, v. 82, p.174-80, 1991.
- GOLDBERG, H., LUSK, E., MOORE, J., NOWELL, P.C., BESA, E. Survey of exposure to genotoxic agents in primary myelodysplastic syndrome: correlation with chromosome patterns and data on patients without hematological disease. **Cancer Res.**, v. 50, p. 6876-81, 1990.
- GOLDFARB, M.P. The transforming genes in many types of tumors are c ras. IN: **Mechanisms of cellular transformation by carcinogenic agents** - section 126. Ed. Grunberger, D. & Goff, S.P. Pergamon Press, Oxford, 1987.
- GONÇALVES, F.M. *Estudo clínico-epidemiológico em trabalhadores de campanhas de saúde pública expostos cronicamente a inseticidas - SUCEN - São José do Rio Preto - SP.* Ribeirão Preto, 1991. 119p. Dissertação (Mestrado em Medicina Preventiva) - FMRP - USP.
- GRAFF, J.R., BOGHAERT, E.R., DE BENEDETTI, A., TUDOR, D.L., ZIMMER, C.C., CHAN, S.K., ZIMMER, S.G. Reduction of translation initiation factor 4E decreases the malignancy of ras-transformed cloned rat embryo fibroblasts. **Int. J. Cancer**, v. 60, n.2, p.255-63, 1995.
- GREER, C.E., PETERSON, S.L., NANCY, H.T., KIVIAT, B., MANOS, M.M. PCR amplification from paraffin-embedded tissues. Effects of fixative and fixation time. **Am. J. Clin. Pathol.** v. 95, p. 117-24, 1991.



- GROOPMAN, J.D., WOGAN, G.N., ROEBUCK, B.D., KENSLER, T.W. Molecular biomarkers for aflatoxins and their application to human cancer prevention. **Cancer Res.**, v. 54, n. 7 (supl.), p. 1907s-11s, 1994.
- GUERRERO, I., VILLA SANTE, A., CORCES, V., PELICER, A. Activation of a *c-K-ras* oncogene by somatic mutation in mouse lymphomas induced by gamma radiation. **Science**, v.225, n. 4667, p. 1159-62, 1984.
- HAGAZ, N.G. & VIOLA, M.V. Chromosome microdissection and cloning - A practical guide. Academic Press, San Diego, 1993.
- HASHIMOTO, E.M. *Estudo cromossômico em linfócitos de aplicadores de inseticidas*. São José do Rio Preto, 1990.105p. Dissertação(Mestrado em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Genética) - IBILCE, UNESP.
- HELDIN, C-H. Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. **Cell**, v. 80, n. 2, p. 213-23, 1995.
- HELZLSOUER, K.J. Serological markers of cancer and their applications in clinical trials. **Cancer Res.**, v. 54, n. 7 (supl.), p. 2011s-4s, 1994.
- HIGINBOTHAM, K.G., RICE, J.M., BUZARD, G.S., PERANTONI, A.O. Activation of the *K-ras* gene by insertion mutations in chemically induced rat renal mesenchymal tumors. **Oncogene**, v. 9, n. 9, p. 2455-9, 1994.
- HIRAI, H., KOBAYASHI, Y., MANO, H., HAGIWARA, K., MARU, Y., OMINE, M., MIZOGUCHI, H., NISHIDA, J., TAKAKU, F. A point mutation at codon 13 of the *N-ras* oncogene in myelodysplastic syndrome. **Nature**, v. 327, p. 430, 1987.
- HOLMQUIST, G. The mechanism of C-banding: depurination and β -elimination. **Chromosoma**, v. 72, n. 2, p. 203-24, 1979.
- HUNTER, T. A thousand and one protein kinases. **Cell**, v. 50, p. 823-9, 1987.
- HUNTER, T. Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. **Cell**, v. 80, n. 2, p. 225-36, 1995.

INFANTE, P.P., EPSTEIN, S.S., NEWTON Jr., W.A. Blood dyscrasias and childhood tumors and exposure to chlordane and heptachlor. **Scan. J. Environ. Health**, v. 4, p. 137-50, 1978.

LARINI, L. *Toxicologia dos inseticidas*. Servier, São Paulo, 1979.

INOKUCHI, K., AMURO, N., FUTAKI, M., DAN, K., SHINOHARA, T., KURIYA, S., OKAZAKI, T., NOMURA, T. Transforming genes and chromosome aberrations in therapy-related leukemia and myelodysplastic syndrome. **Ann. Hematol.**, v. 62, n.6, p. 211-6, 1991.

JACOBS, A., GEARY, C., OSMAN, J. Haematological disorders and occupational hazards: a british society. **Brit. J. Haemat.**, v. 84, p. 555-7, 1993.

JANES, P.W., DALY, R.J., deFAZIO, A., SUTHERLAND, R.L. Activation of the Ras signalling pathway in human breast cancer cells overexpressing *erbB-2*. **Oncogene**, v. 9, n. 12, p. 3601-8, 1994.

LOWY, D.R. & WILLIAMS, R.M. Function and regulation of Ras. *Annu. Rev.*

JANICKI, K. Leukemias in the Cracow region in the years 1961-1968 and contamination of the environment by pesticides. **Acta. Med. Pol.**, v.13, p. 49-71, 1972.

MAHER, J., BAKER, O.A., MANNING, M., DING, N.J., ROBERTS, I.A.G. Evidence for

JOHNSON, R.A., MANDEL, J.S., GIBSON, R.W., MANDEL, J.H., BENDER, A.P., GUNDERSON, P.D., RENIER, C.M. Data on prior pesticide use collected from self- and proxy respondents. **Epidemiology**, v. 4, p.157-64, 1993.

MANGUES, R., KAHN, J.M., SEIDMAN, J., FELIPE, A. An overexpressed N-ras proto-

JONVEAUX, P. PCR amplification of specific DNA sequences from routinely fixed chromosomal spreads. **Nucleic Acids Res.**, v.19, n.8, p. 1946, 1991.

KADOHAMA, T., TSUJI, K., OGAWA, K. Indistinct cell cycle checkpoint after u.v. damage

in H-ras-transformed mouse liver cells despite normal p53 gene expression. **Oncogene**, v. 9, n. 10, p. 2845-52, 1994.

1993

KASHYAP, S.K. Health surveillance and biological monitoring of pesticides formulators in India. **Toxicol. Lett.**, v. 33, p. 107-14, 1986.

portaria nº 3214, de 8/5/79. Segurança e Medicina do Trabalho - Lei nº 6514, de

KUMAR, R., SUKUMAR, S., BARBACID, M. Activation of *ras* oncogenes preceding the onset of neoplasia. **Science**, v.248, n.4959, p.1101-4, 1990.

MAO, L. & SIDRANSKY, D. Cancer screening based on genetic alterations in human

KWOK, S. & HIGUCHI, R. Avoiding false positives with PCR. **Nature**, v. 339, p. 237-8, 1989.

MARK, J. How cells cycle toward cancer. *Science*, v. 263, p. 319-21, 1994.

- La VECCHIA, C., NEGRI, E., D'AVANZO, B., FRANCESCHI, S. Occupation and lymphoid neoplasms. **Brit. J. Cancer**, v. 60, p. 385-8, 1989.
- LARINI, L. **Toxicologia dos inseticidas**. Sarvier, São Paulo, 1979.
- LIPKOWITZ, S., GARRY, V.F., KIRSCH, I.R. Interlocus V-J recombination measures genomic instability in agriculture workers at risk for lymphoid malignancies. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 89, p. 5301-5, 1992.
- LIU, E., HJELLE, B., MORGAN, R., HECHT, F., BISHOP, J.M. Mutations of the Kirsten-ras proto-oncogene in human preleukemia. **Nature**, v. 330, p. 186, 1987.
- LORAND, I.C.H., SOUZA, C.A., COSTA, F.F. Haematological toxicity associated with agricultural chemicals in Brazil. **Lancet**, v. 1, p. 404, 1984.
- LOWY, D.R. & WILLUNSEN, B.M. Function and regulation of Ras. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 62, p. 851-91, 1993.
- MAHER, J., BAKER, D.A., MANNING, M., DIBB, N.J., ROBERTS, I.A.G. Evidence for cell-specific differences in transformation by N-, H- and K-ras. **Oncogene**, v. 11, n. 8, p. 1639-47, 1995.
- MANGUES, R., KAHN, J.M., SEIDMAN, I., PELLICER, A. An overexpressed N-ras proto-oncogene cooperates with N-methylnitrosourea in mouse mammary carcinogenesis. **Cancer Res.**, v. 54, n. 24, p. 6395-401, 1994.
- MANSOOR, A.M., BHARADWAJ, T.P.R., SETHURAMAN, S., CHANDY, M., PUSHPA, V., KAMADA, N., MURTHY, P.B.K. Analysis of karyotype, SCE, and point mutation of RAS oncogene in indian MDS patients. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 65, p. 12-20, 1993.
- MANUAL DE LEGISLAÇÃO ATLAS - Normas Regulamentadoras (NR) aprovadas pela portaria nº 3.214, de 8/6/78. Segurança e Medicina do Trabalho - Lei nº 6514, de 22/12/1977 - v. 16, 9ª edição, Atlas, SP, 1984.
- MAO, L. & SIDRANSKY, D. Cancer screening based on genetic alterations in human tumors. **Cancer Res.** v. 54, n. 7, p. 1939-40, 1994.
- MARX, J. How cells cycle toward cancer. **Science**, v. 263, p. 319-21, 1994.

- MATSUO, S., TOYOKUNI, S., OSAKA, M., HAMAZAKI, S., SUGIYAMA, T. Degradation of DNA in dried tissues by atmospheric oxygen. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.208, n.3, p. 1021-7, 1995.
- Mc MAHON, G., HANSON, L., LEE, J-J, WOGAN, G.N. Identification of an activated c-Ki-ras oncogene in rat liver tumors induced by aflatoxin B1. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 83, n. 24, p. 9418-22, 1986.
- MELO, M.B. *Mutações do oncogene N-ras em leucemias agudas*. Campinas, 1994. 90p. Tese (Mestrado em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Genética Médica) - Instituto de Biologia - UNICAMP.
- MELO, M.B., SALES, T.S.I., LORAND-METZE, I, COSTA, F.F. Rapid method for isolation of DNA from glass slide smears for PCR. **Acta Haematologica**, v.87, p. 214-5, 1992.
- MEZZANOTTE, R., VANNI, R., FLORE, O., FERRUCCI, L., SUMMER, A.T. Ageing of fixed cytological preparations produces degradation of chromosomal DNA. **Cytogenet. Cell Genet.**, v. 48, n. 1, p. 60-2, 1988.
- MINELLI, E.V. *Análise de resíduos de pesticidas organoclorados em soro sanguíneo: desenvolvimento de metodologia e sua aplicação*. Araraquara, 1993. 68p. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Instituto de Química - UNESP.
- MULCAHY, L.S., SMITH, M.R., STACEY, D.W. Requirement for *ras* proto-oncogene function during serum-stimulated growth of NIH 3T3 cells. **Nature** (1985), v.313, n.5999, p.241-3.
- MULDER, I., DRIJVER, M., KREIS, I.A. Case-control study on the association between a cluster of childhood haematopoietic malignancies and local environmental factors in Aalsmeer, The Netherlands. **J. Epidemiol. Community Health**, v. 8, p. 161-5, 1994.
- NERI, A., KNOWLES, D.M., GRECO, A. McCORMICK, F., DALLA-FAVERA, R. Analysis of RAS oncogene mutations in human lymphoid malignancies. **PNAS**, v. 85, n. 3, p. 9268-72, 1988.



- PERKINS, A.S., WOUDE, G.F.V. *Principles of molecular cell biology of cancer*. Molecular diagnosis of cancer. G. Wagener & S. Neumann (ed) Springer-Verlag, 1993.
- NUNES, M.V. *Efeitos da permetrina na expressão da carga genética relativa ao cromossomo X e de componentes do valor adaptativo de Drosophila melanogaster*. São José do Rio Preto, 1991. 119p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Genética)- IBILCE, UNESP.
- NUNES, M.V., MELO, M.B., COSTA, F.F., VARELLA-GARCIA, M. A simple technique for isolation of DNA suitable for PCR amplification from cytogenetic preparations. **Brazilian J. Genet.**, v. 18, n.3, p. 489-90, 1995.
- O'LEARY, J.J., BROWNE, G. LANDERS, R.J., CROWLEY, M., BAILEY HEALY, I., STREET, J.T., POLLOCK, A.M., MURPHY, J., JOHNSON, M.I., LEWIS, F.E., MOHAMDEE, O., CULLINANE, C., DOYLE, C.T. The importance of fixation procedures on DNA template and its suitability for solution-phase polymerase chain reaction and PCR *in situ* hybridization. **Histochem. J.** v. 26, p. 337-46, 1994.
- ORITA, M., HIROYUKI, I., KANAZAWA, H., HAYASHI, K., SEKIYA, T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.86, p. 2766-70, 1989.
- PAI, E.F., KRENGEL, U., PETSKE, G.A., GOODY, R.S., KABSCH, W., WITTINGHOFFER, A. Refined crystal structure of the triphosphate conformation H-RAS P21 at 1,35 Angstroms resolution: implications for the mechanism of GTP hydrolysis. **EMBO J.**, v. 9, p. 2351, 1990.
- PÁLDY, A., PUSKÁS, N., VINCZE, K., HADHÁZI, M. Cytogenetic studies on rural populations exposed to pesticides. **Mut. Res.**, v. 187, p. 127-32, 1987.
- PAULA, G. A. *Testes de hipóteses para o risco relativo em estudos epidemiológicos*. Campinas, 1982, 118 p. Dissertação (Mestrado em Estatística). Instituto de Matemática, Estatística e Ciências da Computação, UNICAMP.
- PEDNEKAR, M.D., GANDHI, S.R., NETRAWALI, M.S. Evaluation of mutagenic activities of endosulfan, phosalone, malathion, and permethrin, before and after metabolic activation, in the Ames *Salmonella* test. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 38, p. 925-33, 1987.

- PERKINS, A.S., WOUDE, G.F.V. Principles of molecular cell biology of cancer: oncogenes. In: DeVitta, V.T. *et al.* **Cancer: Principles & Practice of Oncology**. (Ed.). 4ª edição. Philadelphia. J.B.Lippincott Co., p. 35-59, 1993.
- PINGOUD, A. The polymerase chain reaction: methodology and diagnostic potential. In: Molecular diagnosis of cancer. C. Wagener & S. Neumann (ed) Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1993.
- PITOT, H.C. The molecular biology of carcinogenesis. **Cancer**, v.72, n.3, p.962-70, 1993.
- POLLACK, P.S. Proto-oncogenes and the cardiovascular system. **Chest**, v. 107, p. 826-35, 1995.
- POULSEN, H. E. & LOFT, S. Early biochemical markers of effects: enzyme induction, oncogene activation and markers of oxidative damage. **Toxicology**, v. 101, n. 1,2, p. 55-64, 1995.
- PRENDERGAST, G.C., KHOSRAVI-FAR, R., SOLSKI, P.A., KURZAWA, H., LEBOWITZ, P.F., DER, C.J. Critical role of Rho in cell transformation by oncogenic Ras. **Oncogene**, v. 10, n.12, p. 2289-96, 1995.
- QUINTANILLA, M., BROWN, K., RAMSDEN, M., BALMAIN, A. Carcinogen-specific mutation and amplification of Ha-ras during mouse skin carcinogenesis. **Nature**, v. 322, n. 6074, p. 78-80, 1986.
- RABELLO, M.N., BEÇAK, W., DE ALMEIDA, W.F., PIGATI, P., UNGARO, M.T., MURATA, T., PEREIRA, A.B. Cytogenetic study on individuals occupationally exposed do DDT. **Mut. Res.**, v. 28, p. 449-54, 1975.
- RADICH, J.P., KOPECKY, K.J., WILLMAN, C.L., WEICK, J., HEAD, D., APPELBAUM, F., COLLINS, S.J. N-ras mutations in adult de novo acute myelogenous leukemia: prevalence and clinical significance. **Blood**, v. 76, n.4, p.801-7, 1990.
- RAK, J., MITSUHASHI, Y., BAYKO, L., FILMUS, J., SHIRASAWA, S., SASAZUKI, T., KERBEL, R.S. Mutant *ras* oncogenes upregulate VEGF/VPF expression: implications for induction and inhibition of tumor angiogenesis. **Cancer Res.**, v. 55, n. 20, p. 4575-80, 1995.

- RAWN, J.D. Biochemistry. Neil Patterson Publishers. Burlington, North Carolina, USA, 1989.
- RIBOLI, E. & CUMMINGS, J.H. Ole Moller jensen memorial symposium on nutrition and cancer. **Int. J. Cancer**, v. 55, n. 4, p. 531-7, 1993.
- RICHARDSON, S., ZITTOUN, R., BASTUJI-GARIN, S., LASSERRE, V., GUIHENNEUC, C., CADIOU, M., VIGIE, F., LAFFONT-FAUST, I. Occupational risk factors for acute leukaemia: a case-control study. **Int. J. Epidemiol.**, v. 21, n. 6, p. 1063-1073, 1992.
- RIGGS, J.E. Carcinogenesis, genetic instability and genomic entropy: insight derived from malignant brain tumor age specific mortality rate dynamics. **J. Theor. Biol.**, v.170, n.4: p. 331-8, 1994.
- RITA, P., REDDY, P.P., REDDY, S.V. Monitoring of workers occupationally exposed to pesticides in grape gardens of Andhra Pradesh. **Environ. Res.**, v. 44, p. 1-5, 1987.
- RODENHUIS, S. & SLEBOS, R.J.C. Clinical significance of *ras* oncogene activation in human lung cancer. **Cancer Res.**, v.52(Suppl.), p.2665s-9s, 1992.
- RODRIGUEZ, G.B. *Desenvolvimento da metodologia de LSSP-PCR e sua aplicação ao estudo da variabilidade da região controle do DNA mitocondrial humano*. Belo Horizonte, 1995. 172p. Tese (Doutorado em Ciências) - UFMG.
- RUPA, D.S., RITA, P., REDDY, P.P., REDDY, O.S. Screening of chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges in peripheral lymphocytes of vegetable garden workers. **Human Toxicol.**, v. 7, p. 333-6, 1988.
- RUPA, D.S., REDDY, P.P., REDDY, O.S. Analysis of sister-chromatid exchanges, cell kinetics and mitotic index in lymphocytes of smoking pesticide sprayers. **Mut. Res.**, v. 223, p. 253-8, 1989.
- RUSCH, V.W. & DMITROVSKY, E. Molecular biologic features of non-small cell lung cancer. Clinical implications. **Chest Surg. Clin. N. Am.**, v. 5, n.1, p. 39-55, 1995.
- RYBERG, D., LINDSTEDT, B.A., ZIENOLDDINY, S., HAUGEN, A. A hereditary genetic marker closely associated with microsatellite instability in lung cancer. **Cancer Res.**, v. 55, n. 18, p. 3996-9, 1995.

- SABBATINI, A.R.M., BASOLO, F., VALENTINI, P., MATTII, L., CALVO, S., FIORE, L., CIARDIELLO, F., PETRINI, M. Induction of multidrug resistance (MDR) by transfection of MCF-10A cell line with *c-Ha-ras* and *c-erbB-2* oncogenes. **Int. J. Cancer**, v. 59, n.2, p. 208-11, 1994.
- SAEZ, R., CHAN, A.M-L., MIKI, T., AARONSON, S.A. Oncogenic activation of human *R-ras* oncogenes. **Oncogene**, v. 9, n. 10, p. 2977-82, 1994.
- SAIKI, R.K., SCHARF, S., FALOONA, F., MULLIS, K.B., HORN, G.T., ERLICH, H.A., ARNHEIM, M. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction sites analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, v. 230, p. 1350-4, 1985.
- SAIKI, R.K., GELFAND, D.H., STOFFEL, S., SCHARF, S.J., HIGUSHI, R., HORN, G.T., MULLIS, K.B., ERLICH, H.A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, v. 239, p. 487-491, 1988.
- SAITO, I., KAWAMURA, N., UNO, K., HISANAGA, N., TAKEUCHI, Y., ONO, Y., IWATA, M., GOTO, M., OKUTAMI, H., MATSUMOTO, T., FUKAYA, 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**, v. 58, p. 91-7, 1986.
- SANDLER, D.P. & COLLMAN, G.W. Cytogenetic and environmental factors in the etiology of the acute leukemias in adults. **Am. J. Epidemiol.**, v. 126, p. 1017-32, 1987.
- SAWYERS, C.L., McLAUGHLIN, J., WITTE, O.N. Genetic requirement for Ras in the transformation of fibroblasts and hematopoietic cells by the *Bcr-Abl* oncogene. **J. Exp. Med.**, v. 181, p. 307-13, 1995.
- SCAMBIA, G., CATOZZI, L., BENEDETTI-PANICI, P., FERRANDINA, G., BATTAGLIA, F., GIOVANNINI, G., DISTEFANO, M., PELLIZZOLA, D., PIFFANELLI, A., MANCUSO, S. Expression of ras p21 oncoprotein in normal and neoplastic human endometrium. **Gynecol. Oncol.** v. 50, p. 339-46, 1993.
- SENN, H.P., JIRICNY, J., FOPP, M., SCHMID, L., MORONI, C.H. Relapse cell population differs from acute onset clone as shown by absence of the initially activated *N ras* oncogene in a patient with acute myelomonocytic leukemia. **Blood**, v. 72, n. 3, p. 931-935, 1988.

- SHACK, S., CHEN, L-C., MILLER, A.C., DANESI, R., SAMID, D. Increased susceptibility of *ras*-transformed cells to phenylacetate is associated with inhibition of p21^{ras} isoprenylation and phenotypic reversion. **Int. J. Cancer**, v. 63, n. 1, p. 124-9, 1995.
- SHARP, D.S., ESKENAZI, B., HARRISON, R., CALLAS, P., SMITH, A.H. Delayed health hazards of pesticide exposure. **Ann. Rev. Public Health**, v. 7, p. 441-71, 1986.
- SIDRANSKY, D. Molecular markers in cancer: can we make better predictions? **Int. J. Cancer**, v. 64, p. 1-2, 1995.
- SLEBOS, R.J.C., HRUBAN, R.H., DALESIO, O., MOOI, W.J., OFFERHAUS, G.J.A., RODENHUIS, S. Relationship between K-ras oncogene activation and smoking in adenocarcinoma of the human lung. **J. Natl. Cancer Institute**, v. 83, n.14, p.1024-7, 1991.
- SMITH, M.R., MATTHEWS, N., JONES, K.A., KUNG, H-F. Biological action of oncogenes. **Pharmac. Ther.**, v. 58, p. 211-36, 1993.
- STANLEY, L.A. Molecular aspects of chemical carcinogenesis: the roles of oncogenes and tumour suppressor genes. **Toxicology**, v. 96, n.3, p.173-94, 1995.
- STAUSS, H.J. Mutant Ras proteins and peptides: bad news for tumors. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 87, n. 24, p. 1820-2, 1995.
- SUKHATME, V.P., CAO, X., CHANG, L.C., TSAI-MORRIS, C-H, STAMENKOVICH, D., FERREIRA, P.C.P., COHEN, D.R., EDWARDS, S.A., SHOWS, T.B., CURRAN, T., LE BEAU, M.M., ADAMSON, E.D. A zinc finger-encoding gene coregulated with *c-fos* during growth and differentiation, and after cellular depolarization. **Cell**, v.53, p. 37-43, 1988.
- TELANG, S., TONG, C., WILLIAMS, G.M. Epigenetic membrane effects of a possible tumor promoting type on cultured liver cells by the non-genotoxic organochlorine pesticides chlordane and heptachlor. **Carcinogenesis**, v. 3, p. 1175-8, 1982.
- TIEN, H-F., WANG, C-H., CHUANG, S-M., CHOW, J-M., LEE, F-Y., LIU, M-C., CHEN, Y-C., SHEN, M-C, LIN, D.T., LIN, K-H. Cytogenetic studies, ras mutation, and clinical characteristics in primary myelodysplastic syndrome - a study on 68 chinese patients in Taiwan. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.74, p. 40-9, 1994.

- TREDANIEL, J., ZALCMAN, G., DOURIEZ, E. Gènes et enzymes impliqués dans le métabolisme des carcinogènes. **Bull. Cancer**, v.82, Suppl. 2, 77s-84s, 1995.
- van ELSAS, A., ZERP, S. van der FLIER, S., KRUSE-WOLTERS, M., VACCA, A., RUITER, D.J., SCHRIER, P. Analysis of N-ras mutations in human cutaneous melanoma: tumor heterogeneity detected by polimerase chain reaction/single strand conformation polymorphism analysis. **Recent Results in Cancer Research**, v. 139, p. 57-67, 1995.
- van MANSFELD, A.D.M. & BOS, J.L. PCR-based approaches for detection of mutated RAS genes. **PCR Meth. Appl.**, v. 1, p. 211-6, 1992.
- VERMA, R.S. & BABU, A. Human chromosomes - principles and techniques. 2ed. McGraw-Hill, international ed., 1995.
- VIEL, J.F. & RICHARDSON, S.T. Adult leukemia and farm practices: an alternative approach for assessing geographical pesticide exposure. **Soc. Sci. Med.**, v. 32, p. 1067-73, 1991.
- VIEL, J.F. & RICHARDSON, S.T. Lymphoma, multiple myeloma and leukaemia among french farmers in relation to pesticide exposure. **Soc. Sci. Med.**, v. 37, p. 771-7, 1993.
- VINEIS, P., CANTOR, K., GONZALES, C., LYNGE, E., VALLYATHAN, V. Occupational cancer in developing countries. **Int. J. Cancer**, v. 62, p. 655-60, 1995.
- VOET, D. & VOET, J.G. **Biochemistry**. 2ed. John Wiley & Sons, New York, 1995.
- WANG, H.H. & MacMAHON, B. Mortality of pesticide applicators. **J. Occup. Med.**, v. 21, p. 741-4, 1979a.
- WANG, H.H. & MacMAHON, B. Mortality of workers employed in the manufacture of chlordane and heptachlor. **J. Occup. Med.**, v. 21, p. 745-8, 1979b.
- WASYLYC, C., MAIRA, S-M., SOBIESZCZUK, P., WASYLYK, B. Reversion of Ras transformed cells by Ets transdominant mutants. **Oncogene**, v. 9, n. 12, p. 3665-73, 1994.

- WEINBERG, R. The molecular basis of oncogenes and tumor suppressor genes. **A. N.York. Acad. Sci.**, v.758, p. 331-8, 1995.
- WESTRA, W.H., OFFERHAUS, J.A., GOODMAN, S.N., SLEBOS, R.J.C., POLAK, M., BAAS, I.O., RODENHUIS, S., HRUBAN, R.H. Overexpression of the p53 tumor suppressor gene product in primary lung adenocarcinomas is associated with cigarette smoking. **Am. J. Surg. Pathol.**, v.17, n.3, p.213-20, 1993a.
- WESTRA, W.H., SLEBOS, R.J.C., OFFERHAUS, G.J.A., GOODMAN, S.N., EVERS, S.G., KENSLER, T.W., ASKIN, F.B., RODENHUIS, S., HRUBAN, R.H. *K-ras* oncogene activation in lung adenocarcinomas from former smokers. **Cancer**, v.72, n.2, p. 432-8, 1993b.
- WHARTENBY, K.A., ABOUD, C.N., MARROGI, A. J., RAMESH, R., FREEMAN, S.M. The biology of cancer gene therapy. **Laboratory Investigation**, v. 72, n.2, p.131-45, 1995.
- WHITE, M.A., NICOLETTE, C., MINDEN, A., POLVERINO, A., van AELST, L., KARIN, M., WIGLER, M.H. Multiple Ras functions can contribute to mammalian cell transformation. **Cell**, v. 80, n. 4, p. 533-41, 1995.
- WIEST, J.S., BURNETT, V.L., ANDERSON, M.W., REYNOLDS, S.H. A novel mechanism of *in vivo* *ras* gene activation involving tandem duplication of coding sequences. **Oncogene**, v. 9, n. 9., p. 2449-54, 1994.
- YAKUBOVSKAYA, M.S., SPIEGELMAN, V., LUO, F.C., MALAEV, S., SALNEV, A., ZBOROVSKAYA, I., GASPARYAN, A., POLOTSKY, B., MACHALADZE, Z., TRACHTENBERG, A.C., BELITSKY, G.A., RONA, Z. High frequency of *k-ras* mutations on normal appearing lung tissues and sputum of patients with lung cancer. **Int. J. Cancer**, v. 63, n. 6, p. 810-4, 1995.
- YODER, J., WATSON, M., BENSON, W.W. Lymphocyte chromosome analysis of agricultural workers during extensive occupational exposure to pesticides. **Mut. Res.**, v. 21, p. 335-40, 1973.
- ZARBL, H., SUKUMAR, S., ARTHUR, A.V., MARTIN-ZANCA, D., BARBACID, M. Direct mutagenesis of *Ha-ras-1* oncogenes by *N*-nitroso-*N*-methylurea during initiation of mammary carcinogenesis in rats. **Nature**, v. 315, n. 6018, p. 382-5, 1985.

