



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À
SAÚDE**

ALYSSON FELLIPE COSTA TELLES

**ANÁLISE DA ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS GENÉTICOS
E A SINTOMATOLOGIA CARACTERÍSTICA DE EXPOSIÇÃO A
AGROTÓXICOS EM TRABALHADORES RURAIS.**

LAGARTO/SE

2017

	ALYSSON FELLIPE COSTA TELLES ANÁLISE DA ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS GENÉTICOS E A SINTOMATOLOGIA CARACTERÍSTICA DE EXPOSIÇÃO A AGROTÓXICOS EM TRABALHADORES RURAIS. 2017
--	--

ALYSSON FELLIPE COSTA TELLES

**ANÁLISE DA ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS GENÉTICOS
E A SINTOMATOLOGIA CARACTERÍSTICA DE EXPOSIÇÃO A
AGROTÓXICOS EM TRABALHADORES RURAIS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Aplicadas à Saúde.

Orientador: Prof. Dra. Claudia Cristina Kaiser.

Co-orientador : Prof. Dr. Felipe Rodrigues Matos.

LAGARTO/SE

2017

ALYSSON FELLIPE COSTA TELLES

**ANÁLISE DA ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS GENÉTICOS
E A SINTOMATOLOGIA CARACTERÍSTICA DE EXPOSIÇÃO A
AGROTÓXICOS EM TRABALHADORES RURAIS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Aplicadas à Saúde.

Aprovada em: ____/____/____

Orientadora: Profa Dra Claudia Cristina Kaiser (Presidente)

1º Examinador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Palanch Repeke (Membro Interno I)

2º Examinador: Profa. Dra. Nalu Teixeira de Aguiar Peres (Membro Externo)

Prof. Dr. Felipe Rodrigues de Matos (Membro Suplente)

PARECER

DEDICATÓRIA

Dedico esse degrau de minha vida acadêmica aos meus avôs João Costa e José Brandão, e em especial e com todo amor do mundo à minha vó Elizabeth (Bezinha), responsáveis por quem sou hoje como pessoa e como profissional. Hoje *in memoriam*, mas vivos em nossos corações para sempre!

Obrigado por todo amor!

De onde estiverem, espero que estejam felizes com essa conquista!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por toda força nas horas em que pensei em fraquejar.

À minha orientadora, Prof. Dra. Claudia Kaiser, por me passar segurança e nunca me deixar desamparado. Por me mostrar de maneira mais profunda a genética, e por me mostrar que ainda tenho muito que aprender! Obrigado mesmo por tudo!

Ao professor Dr.Felipe Rodrigues, que foi de fundamental importância na parte prática deste trabalho, obrigado por dividir seus conhecimentos comigo, e por me tornar um profissional melhor. Ao Prof. Fabiano Alvim-Pereira, pela enorme ajuda com nossas estatísticas, e pelo apoio contínuo aos projetos desenvolvidos.

Aos meus colegas de turma, saibam que de fato, nos tornamos grandes amigos pessoais. Sempre nos ajudando nas dificuldades, nunca houve competição nesses dois anos e meio. Obrigado pela parceria, e que ela se mantenha firme. E em especial aos companheiros de viagem, Flávio, Lili e Tainah, obrigado pelas melhores risadas e pelo incentivo sempre!

À minha mãe Elna e meu irmão Igor, peço desculpas pelos nãoos que tive que dar, mas hoje sei que entendem que era por um objetivo maior, que era concluir esta etapa acadêmica. Obrigado por todo incentivo sempre, amo muito vocês! Que Deus me ajude a poder guardar e zelar por vocês sempre!

Aos meus amigos, obrigado por entenderem as minhas ausências, quando muitas vezes precisei estudar ao invés de encontrar vocês. Em especial, uma amiga que já é da família, e hoje também mestranda, Vânia, sempre me incentivando a focar nos estudos e ser o melhor que eu posso ser. Obrigado de coração!!

Aos meus amigos do Hospital do Coração e do Lacen, por me ajudarem sempre com trocas e liberações para assistir as aulas. Sem vocês, dificilmente teria êxito nesta conquista. Obrigado acima de tudo pela amizade. A Lilian Café, por ser a grande responsável pelo começo desta jornada, e pelo incentivo constante. A Dani e Eduardo, pelo socorro sempre que precisei no laboratório em Lagarto.

Peço a Deus sabedoria daqui em diante, para usar bem o título que almejo obter com esta dissertação. E que outras pessoas a usem bem, para a ciência e para o bem das pessoas.

Obrigado!!

EPIÍGRAFE

**A mente que se abre a uma nova idéia, jamais
voltará a seu tamanho original.**

(Albert Einstein)

RESUMO

Análise da associação entre polimorfismos genéticos e a sintomatologia característica de exposição a agrotóxicos em trabalhadores rurais. Alysson Fellipe Costa Telles, Lagarto-SE, 2017.

Introdução: As colinesterases e a Paraoxonase 1 atuam como mediadores do processo de intoxicação por organofosforado (OF). Monitorar as atividades destas enzimas e conhecer a variabilidade genética da população agrícola é de grande importância na avaliação de possíveis grupos de risco para intoxicação por OF.

Objetivo: Investigar associação dos polimorfismos genéticos rs1803274 (gene *BChE*) e rs662 e rs854560 (gene *PON1*) com sintomatologia característica de exposição a agrotóxicos OF em trabalhadores rurais.

Metodologia: Estudo Caso-controle com abordagem transversal. Composto por 427 pacientes, ambos os gêneros, média de idade de 40,96 ($\pm 12,6$) anos, divididos em: **G1**-226 indivíduos com presença de sintomas característicos de intoxicação por OF e **G2**-201 indivíduos sem presença de sintomas; foram genotipados para 3 SNPs: rs1803274 (gene *BChE*), rs662 e rs854560 (gene *PON1*). Além disso, os parâmetros socioeconômicos, sociodemográficos, perfil de saúde e a atividade de *BChE* foram analisados. Para teste de associação das variáveis categóricas, foi utilizado o teste Qui-Quadrado e Exato de Fischer. Para os testes dos modelos genéticos a Regressão Logística Binária foi utilizada no Modelo Aditivo e o Teste Exato de Fisher e teste Qui-Quadrado nos Modelos Dominante e Recessivo ($p < 0,05$). **Resultados:** Associação estatisticamente significativa para local de residência com apresentação de sintomas; entre o rs1803274 e sintomas, no modelo Recessivo. A fraqueza muscular se mostrou o sintoma mais representativo, apresentando uma associação estatística com o rs1803274, no modelo Aditivo e Dominante. A atividade de *BChE* apresentou associação com o rs662, no modelo Recessivo, demonstrando que indivíduos com este SNP tem maior chance de apresentar atividade reduzida para esta enzima. **Conclusão:** Os resultados demonstram que os fatores intrínsecos (SNPs) e extrínsecos (local de residência) estudados podem modular o processo de intoxicação por OF, aumentando ou reduzindo a susceptibilidade dos indivíduos envolvidos.

Descritores: Organofosforado; Saúde Ocupacional; Polimorfismos Genéticos; Butirilcolinesterase; Paraoxonase.

ABSTRACT

Analysis of the association of genetic polymorphisms with characteristic symptomatology of exposure to pesticides in rural workers. Alysson Fellipe Costa Telles, Lagarto-SE, 2017.

Introduction: Cholinesterases and Paraoxonase 1 are mediators of poisoning process by organophosphate (OP). Monitor the activities of these enzymes and know the genetic variability of the agricultural population is of great importance in the evaluation of possible risk groups for poisoning OP. **Objective:** This case-control study aimed to investigate the association of genetic markers (tag SNPs) in BChE and PON1 genes with characteristic symptoms of exposure to OP pesticides in rural workers. **Methodology:** 427 patients, both sexes, mean age 40.96 years old, divided into 226 with and 201 without characteristic symptomatology of exposure to pesticides, were genotyped for three tag SNPs, rs1803274 (BChE gene), rs662 e rs854560 (PON1 gene). Also, socio-demographic and economic parameters were analyzed. BChE activity was demonstrated, as well as the profile of workers' health was evaluated. For the test of association of the categorical variables, the Chi-square test and Fisher's exact test. For the genetic models tests the Binary Logistic Regression was used in the Additive Model and Fisher's Exact Test and Chi-Square Test in the Dominant and Recessive Models ($p < .05$). **Results:** Association statistically significant for place of residence with symptoms presentation; between the rs1803274 and symptoms, in the Recessive model. Muscular weakness was the most representative symptom, presenting a statistical association with rs1803274, in the Additive and Dominant model. BChE activity was associated with rs662 in the Recessive model, demonstrating that individuals with this SNP have a higher chance of presenting reduced activity for this enzyme. **Conclusion:** The results demonstrate that the intrinsic factors (SNPs) and extrinsic (residence) studied can modulate the process of intoxication by OR, increasing or reducing the susceptibility of the individuals involved.

Key-words: Organophosphates; Occupational Health; Genetic Polymorphisms; Butyrylcholinesterase; Paraoxonase.

LISTA DE FIGURAS, QUADROS E TABELAS

Figura 1. Estrutura Química do organofosforado.	18
Quadro 1. Principais causas de intoxicação notificadas no SINITOX nos anos de 2011 e 2012.	20
Quadro 2: Principais formas de intoxicação por agrotóxicos notificadas no SINITOX nos anos de 2011 e 2012. (Fonte: SINITOX, 2017).	21
Quadro 3: Diferenças entre Mutação e Polimorfismo.	25
Quadro 4. Sequência do desenho dos primers adquiridos para os SNPs.	33
Tabela 1. Frequência de distribuição absoluta e percentual dos trabalhadores rurais de acordo com as variáveis socioeconômicas.	36
Tabela 2. Frequência de distribuição absoluta e relativa dos trabalhadores rurais, com relação à presença de sintomas.	37
Tabela 3. Tabela de associação entre as variáveis socioeconômicas e a presença de sintomatologia característica da exposição ao OF.	37
Tabela 4. Frequência de distribuição absoluta e relativa dos trabalhadores rurais, com relação à determinação da atividade da colinesterase plasmática (BChE)	38
Tabela 5. Distribuição das frequências alélicas da amostra e da população Yorubá.	38
Tabela 6. Associação entre os genótipos nos modelos Aditivo- Dominante- Recessivo e presença/ausência de sintomas.	39
Tabela 7. Associação entre os genótipos nos modelos Aditivo- Dominante- Recessivo e o sintoma "Fraqueza Muscular".	40
Tabela 8. Associação entre os genótipos nos modelos Aditivo- Dominante- Recessivo e o sintoma "Tremor Noturno".	40
Tabela 9. Associação entre os genótipos nos modelos Aditivo- Dominante- Recessivo e o sintoma "Convulsão".	41
Tabela 10. Associação entre os genótipos nos modelos Aditivo- Dominante- Recessivo e a atividade da BChE.	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BChE	Butirilcolinesterase
PON	Paraoxonase
OF	Organofosforado
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
AChE	Acetilcolinesterase
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
EPI	Equipamento de Proteção Individual
SINITOX	Sistema Nacional de Informações Tóxico Farmacológicas.
CIAT	Centro de Informação e Assistência Toxicológica.
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação.
OPAS	Organização Pan Americana de Saúde
RNA	Ácido Ribonucleico.
DNA	Ácido Desoxirribonucleico.
DeCS	Descritores em Ciências da Saúde
mRNA	RNA mensageiro
ExAC	Exome Aggregation Consortium
NUPAST	Núcleo de Pesquisa e Atenção à Saúde do Trabalhador.
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.
CEREST	Centro de Referência em Saúde do Trabalhador.
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CCEB	Critério de Classificação Econômica do Brasil.
ABEP	Associação Brasileira de Empresas de Pesquisa.

SUMÁRIO

1. Introdução	13
2. Revisão de Literatura	16
2.1. Agrotóxicos	16
2.2. Agrotóxicos Organofosforados	17
2.3. Intoxicação por OF e Risco Ocupacional	18
2.4. Biomarcadores de Intoxicação por OF	22
2.5. Variabilidade Genética	24
2.6. Polimorfismos genéticos e Intoxicação por OF	28
3. Objetivos	29
4. Metodologia	30
4.1. População alvo	30
4.2. Cálculo Amostral	30
4.3. Critérios de Inclusão	30
4.4. Critérios de Exclusão	30
4.5. Organização e Operacionalização dos dados.	30
4.6. Coleta de Dados	31
4.7. Determinação da atividade da Colinesterase Plasmática (BChE)	32
4.8. Extração, purificação e quantificação do DNA.	32
4.9. Real Time PCR	33
4.10. Aspectos Éticos / Biossegurança	34
4.11. Organização e tabulação dos dados coletados.	34
4.12. Análises Estatísticas	35
5. Resultados	36
6. Discussão	42
7. Conclusão	48
8. Referências Bibliográficas	49
Apêndices	58
Anexos	84

1. INTRODUÇÃO

O consumo mundial de agrotóxicos vem aumentando com o passar dos anos, na tentativa de melhorar a produtividade e combater pragas que infestam as lavouras (1). O trabalhador rural faz uso do que existe de tecnologia, e com isso, usa os diversos tipos de substâncias químicas para este fim. Dentre os agrotóxicos mais usados, temos o Organofosforado (OF), tanto pelo fácil acesso, quanto pelo custo-benefício (2–4)

Os OF são caracterizados por apresentar uma molécula de fósforo em sua estrutura e, por apresentarem um bom perfil de lipossolubilidade, são facilmente absorvidos pela pele e mucosas, tanto a respiratória quanto a digestiva (2,3). E, uma vez absorvidos pelo organismo, seus metabólitos possuem a propriedade de se ligarem às colinesterases, Acetilcolinesterase (AChE) e Butirilcolinesterase (BChE), enzimas que têm a função de hidrolisar a acetilcolina residual na sinapse nervosa. Esta ligação é irreversível, e inativa as enzimas, provocando acúmulo de acetilcolina na fenda sináptica, e este evento é responsável pelos sintomas relacionados ao Sistema Nervoso (fraqueza muscular, tremores noturnos e convulsões) (4,5).

Os agrotóxicos estão entre os mais importantes fatores de risco para a saúde da população. A utilização extensiva e as consequentes intoxicações, são consideradas um grave problema de saúde pública, sobretudo entre os trabalhadores rurais, tornando-os a população mais susceptível a exposição e consequentemente aos riscos de intoxicações. Uma vez que o trabalhador está exposto aos OF de forma contínua nas lavouras, seja de forma direta ou indireta, este contato deve ser monitorado. Porém, a subjetividade no diagnóstico de intoxicações se apresenta como um grave problema de saúde pública (6,7).

O monitoramento biológico consiste na determinação do ingrediente ativo ou seus metabólitos, de sistemas biológicos alvo afetados por estas substâncias ou de moléculas, cujo aumento, diminuição ou até mesmo a simples presença em um determinado meio biológico refletem um distúrbio metabólico ou fisiológico associado direta ou indiretamente à exposição (8).

Como marcador de intoxicação, as atividades das colinesterases são mensuradas via ensaios laboratoriais (9). A determinação da atividade das colinesterases AChE e BChE no sangue total e no plasma, respectivamente,

continua sendo amplamente utilizado para diagnosticar a exposição a compostos OP. É um método de pesquisa rápido, conveniente e barato para determinar a exposição a agentes neurotóxicos (10).

Outra enzima que também merece destaque no contexto das intoxicações por Organofosforado é a Paraoxonase 1. Uma vez que esta enzima atua na metabolização dos OF aos quais o indivíduo foi exposto, estas substâncias não se ligarão às enzimas envolvidas no processo sináptico, no caso, as colinesterases, e elas poderão concluir suas funções perante a acetilcolina residual de forma eficaz, preservando a fenda sináptica (11,12).

Além de fatores extrínsecos, como tipo de agrotóxico, dose e via de exposição, fatores intrínsecos também estão envolvidos no contexto das intoxicações por OF(13). A variabilidade genética, por exemplo, é fator determinante para a instalação de possíveis intoxicações. Principalmente no que diz respeito aos polimorfismos do tipo SNP, que são alterações na molécula de DNA em frequência superior a 1% na população, em que apenas uma base nitrogenada é substituída (14). Esse tipo de alteração pode interferir na estrutura da proteína produzida, ou na sua eficácia funcional (15,16).

Para os genes que codificam as enzimas estudadas (BChE e PON1), a literatura descreve uma diversidade de polimorfismos. Os SNPs escolhidos para este estudo foram selecionados levando em consideração a frequência com que eles aparecem na população e, conseqüentemente, a relevância científica e a variedade de literatura pré-existente nos bancos de dados internacionais (/PUBMED) classificam o perfil dos pacientes que apresentam estes polimorfismos como indivíduos com maior ou menor grau de susceptibilidade. Para a enzima BChE, o SNP escolhido foi o rs1803274 (17–19) e para a PON1 foram escolhidos os dois mais frequentes, o rs662 e rs854560 (16,20–23)

O rs1803274 está relacionado com cerca de 30% de redução na atividade da enzima BChE (17,18,24,25), o rs662 em homozigose para a variante Q reduz a atividade da Paraoxonase 1 perante o seu principal substrato, o Paraoxon, mas aumenta com relação a outro substrato, o diazoxon(21,26), e o rs854560, quando o alelo M aparece em homozigose, reduz qualitativamente e quantitativamente a enzima PON1(26,27). Com isso, temos que esses SNPs são moduladores da resposta perante à intoxicação por OF, sendo determinantes na manifestação de

sintomatologias características da exposição continuada, atuando como fator de proteção ou de susceptibilidade à intoxicação por OF.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Agrotóxicos

Os agrotóxicos, também chamados de pesticidas, são substâncias utilizadas de forma abrangente na zona rural, com o intuito de combater pragas e vetores, preservando assim as lavouras de possíveis infestações (1). Se classificam de forma padronizada, observando a estrutura química do composto e o mecanismo de ação. As principais classes são os Organoclorados, Organofosforados, Carbamatos, Piretróides, Triazinos e os Neonicotinoides (13).

O Brasil possui uma economia essencialmente agrícola e o uso dessas substâncias vem aumentando à medida que a tecnologia ganha mais força na produção, e a competitividade de mercado exige aumento e melhoria das safras para atender a demanda interna e externa do país(28) Por esse motivo, o Brasil ocupa atualmente o primeiro lugar no ranking de consumo de agrotóxicos mundialmente, posição alcançada desde 2009, e consome cerca de 84% da produção latino-americana. O faturamento líquido brasileiro da indústria química no ano de 2009 foi equivalente a 6,3 bilhões de dólares (29).

O uso de agrotóxicos no território brasileiro não é uma prática nova. Teve início em meados dos anos 60, quando o Brasil passou por uma fase de modernização de sua agricultura, atividade desde sempre muito significativa na economia do país(28). Junto com a modernização de máquinas e técnicas, o uso dos pesticidas aparece como conduta perante o combate a pragas agrícolas, e se tornou prática rotineira dos trabalhadores rurais, principalmente pelos incentivos dados pelo Governo Federal, pelo Banco Mundial e por empresas norte-americanas. Foi a chamada Revolução Verde pelos estudiosos da época, e essa denominação é utilizada até hoje para fazer referência àquele período de investimento tecnológico (29,30).

À medida que a internacionalização da agricultura brasileira acontecia, principalmente pelo capital externo aqui investido, as práticas com agrotóxicos foram ainda mais incentivadas, e se tornando, a cada década, mais comuns ao trabalhador rural. Contudo, não houve a preocupação por parte das multinacionais em qualificar o trabalhador rural para o uso destes produtos, que eram vendidos na época como “defensivos agrícolas”, e as campanhas promotoras de vendas mostravam apenas

os aspectos positivos de seu uso. Mediante a exposição continuada, e a um conjunto de casos com sintomatologia semelhante, começaram a aparecer os primeiros dados a respeito da intoxicação por agrotóxicos (28,29).

Sergipe aparece no cenário brasileiro com um crescimento similar ao nacional, no que diz respeito ao uso de agrotóxicos, visto que o Estado possui uma forte economia agrícola (31). Em relação ao cultivo predominante, temos o milho como principal representante da produção agrícola sergipana, com pouco mais de 40% da produção, seguido da laranja e demais frutas cítricas (15%) e cana-de-açúcar (14%), segundo publicação do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) em 2012. O último Censo Agropecuário, realizado em 2006, trouxe algumas informações pertinentes. Foram recenseados 100.606 estabelecimentos agropecuários, com cerca de 225.950 pessoas ocupadas com a agricultura no estado (32).

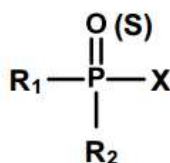
O Relatório de Vigilância em Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos no Estado de Sergipe, publicado em julho de 2015 pelo Ministério da Saúde, traz algumas informações pertinentes ao uso de agrotóxicos em Sergipe. Houve um crescimento do consumo de pesticidas nos últimos anos, sem aumento proporcional na área de uso para plantio. Isto reflete o aumento da produtividade, traduzido pela capacidade de produzir mais na mesma área cultivada. Neste documento, o perfil da agricultura sergipana é definido como prioritariamente familiar, e esta população é caracterizada como portadora de fragilidades socioeconômicas e culturais, tais como baixa escolaridade e pouca instrução, que podem estar influenciando no uso incorreto dos agrotóxicos (31).

2.2. Agrotóxicos Organofosforados (OF).

Um estudo epidemiológico nacional (33) demonstra uma prevalência no uso do agrotóxico do tipo Organofosforado (OF) pelas comunidades agrícolas brasileiras, cujos principais representantes são o Malation, o Paration e o Dimetoato. Esta realidade também é retratada por outros estudos em nível internacional (1,5,34,35). Os OFs são compostos químicos, de fácil acesso e baixo custo, que compõem um vasto grupo de ésteres orgânicos com um átomo de fósforo em sua estrutura, e que, em contato com o homem e com o ambiente, podem acarretar uma série de reações indesejáveis(10).

Devido à sua lipossolubilidade, os Organofosforados podem ser absorvidos pelo organismo por três vias: cutânea, respiratória e digestiva, esta última nos casos de uso para suicídio ou causas acidentais(3,10). Uma vez absorvidos pelo organismo, os compostos passam pelo processo de biotransformação, dividido em duas fases. No primeiro momento, o organismo forma conjugados polares com os OF, introduzindo moléculas como a hidroxila (-OH), a carboxila (-COOH), amina (-NH₂) ou sulfila (-SH) à estrutura química dos mesmos. Em seguida, ocorre o processo de detoxicação, onde há a inclusão de substratos endógenos (Sulfatos, acetatos, aminoácidos ou glucuronidas), que conferem um perfil hidrossolúvel a essas moléculas, e propicia uma correta excreção via sistema urinário(36).

Figura 1: Estrutura de um agrotóxico do tipo Organofosforado.



Fonte: WOREK *et al*, 2016

2.3. Intoxicação por OF e Risco Ocupacional.

O mecanismo de ação de um agrotóxico do tipo OF é bastante abrangente. Ele pode causar reações tóxicas e superficiais, tais como as dermatites e rinites, por um contato direto com a substância, ou causar efeitos sistêmicos, provenientes da sua biotransformação. E perante esta variedade de sinais e sintomas, a sequência e severidade dos eventos dependem da toxicidade do pesticida, da dose a qual o indivíduo foi exposto, e da via de exposição(10).

As principais sintomatologias relatadas em estudos com trabalhadores rurais estão ligadas ao Sistema Nervoso Central (dor de cabeça, tontura, visão turva, Boca seca, fadiga, tremores, agitação/ irritabilidade), ao Sistema Respiratório (tosse, crise alérgica, coriza) ou relacionadas à pele e mucosas (Sudorese, coceira, irritação na pele, petéquias e processos alérgicos) (30,33,34). Em casos mais agressivos, os agrotóxicos podem estar associados a vários tipos de câncer, e até mesmo induzir aberrações cromossômicas(37).

Os mais frequentes relato sistêmico incluem sintomas nicotínicos, muscarínicos e centrais, especialmente aqueles sobre a função motora. Exemplos comuns destes sintomas são a fraqueza muscular, tremores e convulsões(30).

Sabe-se que o principal neurotransmissor dos humanos é a Acetilcolina, descrita pela primeira vez por Otto Loewi em 1921(38). Após a sinapse na junção neuromuscular, cessado o estímulo nervoso, permanece nessa região certa quantidade de acetilcolina residual, que deve ser hidrolisada em Colina + Acetato (Ácido Acético), proporcionando ao músculo o retorno ao estado de relaxamento após ser estimulado pela molécula de acetilcolina, mantendo a homeostase do sistema muscular esquelético. Quem realiza esta função são duas enzimas homólogas, chamadas de Acetilcolinesterase (AChE) e Butirilcolinesterase (BChE) (4,5,10).

Ocorre que os compostos OF, uma vez absorvidos, apresentam a propriedade de inibir as duas colinesterases através de uma ligação irreversível que inativa as colinesterases e resulta em um acúmulo de acetilcolina nas terminações nervosas, estimulando demasiadamente a musculatura, e promovendo os sinais e sintomas relatados(9,17).

Em condição pura, os organofosforados são fracos inibidores de colinesterases. Porém, após a biotransformação desses compostos no fígado, são produzidos metabólitos muito tóxicos, ligados a um grupamento polar (radical hidroxila, amina, carboxila ou tiol) através de reações de oxidação, redução ou hidrólise, e esses metabólitos levam a denominação de análogos oxidativos. Em seguida, os metabólitos polares são conjugados com substratos endógenos (glucuronida, sulfatos, aminoácidos e acetatos), formando produtos hidrossolúveis, e que serão excretados pela urina(36).

Apesar de o uso dos equipamentos de proteção individual (EPI's) ser prática conhecida, abrangendo luvas, máscaras, boné, avental e botas, dentre outros, estudos diversos apontam que o perfil de baixa escolaridade dos trabalhadores rurais contribui bastante para o deficiente entendimento da necessidade e da forma de usar esses mecanismos de proteção, bem como a falta de treinamento por parte dos proprietários das terras (1,39–41), que além de fornecer os materiais, têm por obrigação ensinar os funcionários a usá-los corretamente, de acordo com a Norma Regulamentadora n 31 do Ministério do Trabalho e do Emprego, que aborda a Segurança e Saúde no Trabalho na Agricultura, Pecuária e Silvicultura (42).

Nesse contexto, ainda na década de 80, o Ministério da Saúde, fazendo uso de suas atribuições, viu a necessidade de criar um sistema integrado, que pudesse

notificar os casos de intoxicações gerais, inclusive no que diz respeito aos agrotóxicos, que posteriormente foi denominado de SINITOX (Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas). Nesse sistema, que é vinculado à Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, informações tais quais gênero, idade, tipo de agente tóxico, circunstâncias de intoxicação e vias de ocorrência seriam registrados para fins epidemiológicos e posteriores ações de saúde pública. Este sistema possui caráter de notificação facultativa aos médicos que recebem os casos em seus consultórios, fato que gera irregularidades nas estatísticas geradas por este sistema. A última atualização deste banco de dados data do ano de 2013.(6)

Outro fato que afeta as estatísticas apresentadas pelo SINITOX foi apresentado em um estudo realizado em 2009, que fala sobre a padronização dos dados notificados pelos Centros de Informação e Assistência Toxicológica (CIATs), distribuídos pelos municípios do país. Foram distribuídos 20 casos clínicos hipotéticos para os Centros, que foram orientados a proceder à notificação no SINITOX. A divergência dos dados entre os CIATs foi grande, visto que as variáveis do estudo eram as mais passíveis de análise subjetiva: o agente tóxico envolvido, a circunstância da ocorrência e a via de exposição/intoxicação(7).

Nos anos de 2011 e 2012, os agrotóxicos aparecem como terceiro e quarto lugares, respectivamente, no que diz respeito às principais causas de intoxicação no SINITOX. Dentre as intoxicações por agrotóxico, temos a origem ocupacional na terceira e segunda posição, na mesma sequência (43).

Quadro 1. Principais causas de intoxicação notificadas no SINITOX nos anos de 2011 e 2012.

2011	2012
1º Medicamentos (n=30249)	1º Medicamentos (n= 27008)
2º Domissanitários (n=11557)	2º Drogas de abuso (n= 7999)
3º Agrotóxicos (n= 7560)	3º Domissanitários (n= 7987)
4º Drogas de abuso (n= 6787)	4º Agrotóxicos (n= 6098)
5º Produtos Químicos Industriais (n=6201)	5º Produtos Químicos Industriais (n=5015)

(Fonte: SINITOX, 2013).

Quadro 2: Principais formas de intoxicação por agrotóxicos notificadas no SINITOX nos anos de 2011 e 2012. (Fonte: SINITOX, 2017).

2011	2012
1º Suicídio (n= 2305)	1º Suicídio (n=1903)
2º Acidente Individual (n= 1216)	2º Ocupacional (n=1172)
3º Ocupacional (n = 1146)	3º Acidente Individual (n= 1149)

(Fonte: SINITOX, 2013).

Também contribuindo para as informações sobre intoxicações no país, o SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação), órgão vinculado diretamente ao Ministério da Saúde, a partir de janeiro de 2011 tornou obrigatória (compulsória) a notificação dos casos em toda a federação. Ambos os sistemas trazem dados alarmantes sobre a casuística em questão, apesar de serem dados apenas estimados(6).

A problemática da subnotificação, não diferente de outros sistemas de informação nacionais, é frequente em todo o país, seja falta de padronização das equipes responsáveis pelos registros a nível estadual, pela insuficiência de centros de notificação para atender todo o território nacional, pela falta de acesso às comunidades rurais para este serviço, pela não obrigatoriedade de registro no SINITOX, ou pela não obrigatoriedade no SINAM até o ano de 2010.(6,7)

Além disso, o que se torna perceptível ao analisar os dados notificados é que são informações pertinentes a intoxicações agudas, que se referem a contato recente com o agrotóxico. As intoxicações crônicas, caracterizadas pela exposição a longo prazo, permanecem sem uma epidemiologia concreta para ser analisada, devido à escassez de dados, o que torna o evento da subnotificação ainda maior e mais preocupante no que diz respeito à saúde do trabalhador rural (6).

A população se expõe, seja por forma direta, durante o manuseio e aplicação do produto, ou indireta, através do contato do trabalhador com seus familiares ou pela ingestão de alimentos contaminados. A Organização Pan Americana de Saúde – OPAS – indica que para cada caso registrado de intoxicação por agrotóxicos, cerca de cinquenta casos ocorreram sem notificação ou foram notificados de

maneira equivocada. Visto que não se torna necessário manipular o composto químico para que uma possível intoxicação aconteça, a realidade é bem mais alarmante e preocupante do que os dados refletem. Por conta disto, alguns estudos já classificam a intoxicação por OF como um problema de Saúde Pública no mundo(34,44).

2.4. Biomarcadores de Intoxicação por OF

Apesar de os marcadores de função hepática fornecerem algumas informações pertinentes ao diagnóstico de intoxicação por OF, pois todo xenobiótico absorvido pelo organismo é metabolizado no fígado, as dosagens das atividades das colinesterases ainda são os testes laboratoriais de escolha no monitoramento da intoxicação por OF (45). Isso porque as enzimas hepáticas - TGO (Transaminase Glutâmica Oxalacética) e TGP (Transaminase Glutâmica Pirúvica), por exemplo - são marcadores inespecíficos, visto que qualquer outra situação pode alterar os dados laboratoriais hepáticos, como as hepatites, cirrose e esteatose hepáticas, dentre outros(22).

Pela afinidade que as colinesterases possuem com a acetilcolina, elas se tornam um marcador mais específico e de maior representatividade nos quadros de intoxicação por OF(9), e inclusive são utilizadas pelo Ministério da Saúde no monitoramento dos agentes de saúde que aplicam inseticidas e outros pesticidas de uso nas comunidades(46).

São duas as colinesterases presentes em nosso organismo, e que realizam a hidrólise da acetilcolina residual. A Acetilcolinesterase (ACHE), também chamada de colinesterase verdadeira ou eritrocitária, se apresenta como a enzima com maior especificidade para o substrato acetilcolina (22). Está presente na membrana do eritrócito, possui uma meia vida por volta dos 33 dias, e está direcionado para casos de intoxicação crônica, onde o indivíduo se expõe a longo prazo, mesmo a pequenas doses do OF (17,23,47).

A segunda enzima envolvida no processo de hidrólise dos OF é a Butirilcolinesterase (BChE), multifuncional presente no fígado, plasma, pâncreas e intestino delgado (4). Além de suas funções colinérgicas, esta enzima está associada à hidrólise de outros ésteres, como a butirilcolina, anestésicos locais, algumas drogas (cocaína e heroína) e outros medicamentos(48). A meia vida desta

enzima é de 7 a 12 dias, e por isso a BChE é utilizada para monitorar quadros agudos de intoxicação, ou seja, aqueles cujo contato foi recente e os sintomas se manifestaram rapidamente(23,49). Além disso, a BCHE está relacionada com o índice de massa corpórea e tendências à obesidade. Esta relação com metabolismo e ganho de peso está possivelmente ligada a Grelina, um hormônio peptídeo que atua estimulando o apetite e a obesidade, e que é desativado pela hidrólise promovida pela BCHE. Ou seja, BCHE e Grelina atuam de forma inversamente proporcional na circulação(50,51). Outros estudos (16,52,53), sugerem interferências dos níveis séricos de BCHE em diversas patologias, como por exemplo a dependência de cocaína e diabetes mellitus, respectivamente.

Essas enzimas possuem estrutura química semelhante (cerca de 54% da sua sequência de aminoácidos é idêntica), visto que hidrolisam o mesmo substrato, consequentemente realizando função semelhante (9). Porém, a acetilcolinesterase apresenta um melhor desempenho na hidrólise da acetilcolina, e a butirilcolinesterase atua melhor sobre a butirilcolina, uma droga sintética similar à acetilcolina. Um estudo realizado na Espanha classifica o perfil de atividade de BChE como um método mais sensível, se comparado à AChE, pois esta enzima é inativada mais rapidamente pela intoxicação por OF, e a AChE por sua vez é classificada como mais confiável, se comparada ao perfil de BChE, pela sua maior especificidade ao substrato (22). Realizando uma análise quantitativa, temos que o corpo humano contém cerca de 10 vezes mais BChE do que AChE, sendo estes valores superiores em todos os tecidos do corpo, exceto nos músculos e no cérebro, onde a AChE está presente de forma predominante (17,18).

Além das colinesterases, a Paraoxonase 1 (PON1) também está associada com a intoxicação por OF. Caracterizada por ser também uma hidrolase, de caráter cálcio dependente, e que atua em diversos substratos, inclusive sobre a metabolização dos organofosforados,. Juntamente com a PON2 e a PON3, compõe a família das Paraoxonases, que são produzidas no fígado(12). Elas recebem este nome por conta de seu principal substrato *in vitro*, que é o paraoxon (26,54).

Apesar de possuírem estrutura e função semelhantes, visto que compõem a mesma família de enzimas, elas diferem quanto ao substrato nos quais atuam, e nos locais onde podem ser encontradas. A PON2 é encontrada apenas nos tecidos, se caracterizando como uma enzima intracelular estrita, enquanto a PON1 e a PON3

são encontradas predominantemente no plasma, associadas ao HDL. Quanto ao substrato em que atuam, a PON1 tem afinidade pelos Organofosforados e algumas medicações, enquanto a PON2 e a PON3 tem afinidades para lactonas. As três enzimas possuem caráter antioxidante, sendo a mais potente delas a PON3(55,56).

A PON1 merece destaque no contexto das intoxicações por Organofosforado porque, uma vez que esta enzima atua na metabolização dos OF aos quais o indivíduo foi exposto, estas substâncias não se ligarão às enzimas envolvidas no processo sináptico, no caso, as colinesterases, e elas poderão concluir suas funções perante a acetilcolina residual de forma eficaz, preservando a fenda sináptica(11).

Paralelo a este evento, a PON1 também está correlacionada com o estresse oxidativo, atuando juntamente com o colesterol de alta densidade (HDL), acoplando-se a esta molécula, e reduzindo as taxas de produção de radicais livres pelo organismo, inclusive durante a metabolização dos OF. Sabe-se que nas lipoproteínas de baixa densidade, como o LDL (Low Density Lipoprotein) e o VLDL (Very Low Density Lipoprotein), encontramos menos de 5% da atividade da PON1, e que o HDL possui uma estrutura chamada Apolipoproteína A-I que é responsável pela afinidade com a PON1, além de conferir a estabilidade que a enzima precisa para exercer suas funções (56). Além disso, pode prevenir o acúmulo de lipídeos na Lipoproteína de Baixa Densidade (LDL) e se relaciona com a Doença da artéria Carótida, onde pacientes que apresentam essa patologia possuem níveis reduzidos desta enzima(55).

Ainda sobre a PON1, esta enzima ainda possui propriedades durante o processo inflamatório, atuando como proteína negativa de fase aguda. Com isso, tem-se que os níveis de PON1 tendem a estarem mais baixos em pacientes com processos inflamatórios, processo inversamente proporcional ao que acontece com a Proteína C reativa, que é um marcador positivo de inflamação (56).

2.5. Variabilidade Genética

Além dos fatores extrínsecos que podem trazer prejuízos à população exposta aos OF, tais como grau e tempo de exposição, uso de Equipamentos de Proteção Individual (EPI's) e hábitos e comportamentos adequados dos trabalhadores agrícolas, temos que fatores intrínsecos também podem estar interferindo no mecanismo das intoxicações (13). A variabilidade genética que a

população apresenta, e a presença de genótipos polimórficos pode ser um fator determinante para apresentação de sintomas característicos, e podem tornar o indivíduo mais ou menos susceptível para as possíveis reações pós-exposição (57). Um estudo realizado na Espanha em 2005 afirma que indivíduos expostos à mesmos níveis de OF, durante os mesmos períodos, podem ou não apresentar sintomas e que a susceptibilidade individual é determinante neste processo(45).

As enzimas envolvidas no processo de hidrólise dos OFs são proteínas produzidas através da tradução do RNA, que recebe a informação do DNA presente no núcleo para proceder à síntese protéica (38). Levando-se em conta o alto grau de variabilidade genética que a população em geral possui, e que isso reflete diretamente na manifestação fenotípica, temos que a genética se apresenta como fator determinante para os indivíduos (58,59).

As alterações genéticas, que são mudanças na sequência referência do DNA, se apresentam em duas formas, caracterizadas pela frequência com que ocorrem na população, e pelo grau de acometimento da saúde dos indivíduos que as apresentam (14). As definições são apresentadas no quadro abaixo.

Quadro 3: Diferenças entre Mutação e Polimorfismo.

Mutações	Polimorfismos
Frequência: < 1% da população.	Frequência: > 1% da população.
Grau de acometimento: ligadas a processos patogênicos, onde a presença da mesma caracteriza uma doença específica.	Grau de acometimento: não estão ligadas diretamente a patologias, mas juntamente com interações ambientais, podem representar maior ou menor susceptibilidade a doenças.

Fonte: BALASUBRAMANIAN *et al*, 2004.

Dentre os mecanismos de polimorfismos que ocorrem no ser humano, destacamos os Polimorfismos de Nucleotídeo Único, os SNPs (do inglês, Single Nucleotide Polymorphism), caracterizado pelo DECS (Descritores em Ciências da Saúde) como uma “Variação nucleotídica única em sequência genética, que ocorre com frequência apreciável na população” (60).

Em outras palavras, é uma alteração do tipo substituição de apenas uma das bases nitrogenadas (Adenina, Timina, Citosina e Guanina) que compõem a cadeia de nucleotídeos, em determinado códon, e pode interferir na transcrição gênica, na estabilidade do mRNA, no evento genético chamado Splicing (remoção dos íntrons e junção dos éxons), na estrutura da proteína produzida, ou na sua eficácia funcional (14–16,58).

Cada uma das enzimas descritas como marcadores de intoxicação é produto da codificação de genes diferentes. O gene da AChE está localizado no cromossomo 7, e possui seis éxons, que são as regiões codificadores de proteína (17,47). A BChE é codificada por um gene localizado no braço longo do cromossomo 3, possuindo quatro éxons (15,17,61). Já a PON1 é codificada por um gene presente no braço longo do cromossomo 7, e possui 9 éxons (54,55)(12,54,55).

Com relação aos SNPs mais frequentes, o rs1803274, também chamado de Variante K, está presente no gene que codifica a enzima Butirilcolinesterase (BChE), mais precisamente no Éxon 4, e é caracterizado pela substituição de uma Guanina por uma Adenina usando o formato de transição (troca de purina por purina). Esta mudança na sequência do gene ocorre no códon 539, e resulta na produção de uma Treonina (Thr) ao invés de uma Alanina (Ala) (15,57). Estudos sugerem uma redução de cerca de 30% na atividade desta enzima quando o polimorfismo está presente em homozigose (17,18,24,25), e este comprometimento da atividade enzimática caracteriza o alto risco do portador deste polimorfismo quando exposto à compostos do tipo Organofosforado. (48).

Conhecer o fator genético de sua população na padronização dos valores de referência para as colinesterases principalmente sobre a BChE, é de grande importância para a compreensão do processo de intoxicação por OF. Com isso, tende-se a aumentar a acurácia e um correto diagnóstico de casos de intoxicação por OF e cita inclusive a verificação de sensibilidade à succinilcolina, principal substrato da BChE e usada em procedimentos cirúrgicos (9).

Estudo realizado na Espanha apresenta este SNP como uma limitação ao uso da BChE como marcador de intoxicação aguda por OF, pois a redução da atividade na enzima pode ser atribuída simplesmente à um fator intrínseco, de origem

genética, e não se tratar de uma exposição ocupacional com subsequente processo toxicológico (34).

É importante ressaltar que, apesar da relevância no mecanismo de metabolização da acetilcolina residual, e de também ser inibida pelos OF, para estudos genéticos, não se tornam tão viáveis as análises com os SNPs do gene que codifica a enzima acetilcolinesterase (AChE). De acordo com o banco de dados genéticos ExAC – Exome Aggregation Consortium – que lista as alterações na sequência do DNA observadas e as frequências em diversas populações no mundo, as variantes da enzima ACHE são raras, e só ocorrem em heterozigose (17). Além disso, a molécula de AChE possui um maior grau de conservação entre as espécies e, quando os SNPs estão presentes em casos raros, não estão correlacionadas com perda de função da enzima, nem há relatos de patologias que tenham como causa a presença deste polimorfismo(9).

O rs662, presente no gene que codifica a enzima PON1, é caracterizado pela substituição de uma Adenina por uma Guanina pelo formato de transição (troca de purina por purina), originando uma Arginina (Arg) ao invés de uma Glutamina (Gln) no códon 192. O rs854560, por sua vez, se caracteriza pela substituição de uma Timina por uma Adenina, pelo formato de transversão (troca de purina por pirimidina), e que vai originar o aminoácido Leucina ao invés de uma Metionina (54).

A Paraoxonase 1 está relacionada principalmente com o metabolismo do Paraoxon, sendo o efeito destes polimorfismos também relacionados a este composto. Para o rs662, a genotipagem é representada por Q192R, onde o alelo Q (alelo selvagem) em homozigose confere uma menor atividade para esta enzima, e o alelo R (alelo polimórfico) na mesma condição, confere uma atividade cerca de nove vezes maior (21,26). Com relação a um segundo substrato, o Diazoxon, o perfil é inverso. O alelo Q confere uma melhor atividade que o alelo R (27).

Em relação ao rs854560, a representação é dada por M55L, onde o alelo M (alelo selvagem) em homozigose confere uma menor atividade enzimática e o alelo L (alelo polimórfico) em homozigose aumenta este parâmetro enzimático(26). Ainda sobre o rs854560, sabe-se que o alelo M está relacionado com a redução dos níveis séricos de PON1, ou seja, um indivíduo M55M apresenta alterações qualitativas e quantitativas relacionadas a esta enzima (24,27,62).

Como cada população tem seu perfil de descendência, para estudos genéticos deve-se analisar o perfil de ancestralidade dos indivíduos estudados, pois as frequências alélicas variam de acordo com o perfil encontrado. No Brasil, por exemplo, estudos apontam três principais descendências: Africana, Européia e, em menor proporção, a Norte-Americana. As proporções de ancestralidade variam de acordo com a região do país (63,64).

2.6. Polimorfismos genéticos e intoxicação por OF

Diversos estudos correlacionam a atividade da BChE com a exposição à OF em populações expostas, dentre elas a dos trabalhadores rurais, buscando confirmar a associação significativa entre estes eventos (3,4,30,34,35). Com relação aos polimorfismos, existem trabalhos que avaliam os três polimorfismos escolhidos neste estudo, correlacionando a presença destes com um maior grau de susceptibilidade à intoxicação por OF, ou caracterizando-os com caráter protetivo (9,19,45,47,54,57,62).

Dessa forma, os três polimorfismos apresentados (rs1803274, rs662 e rs854560) podem estar associados ao aparecimento de sintomas decorrentes da exposição por OF, modulando a resposta do indivíduo perante à intoxicação. Portanto, podemos inferir que o fator genético, pode ser determinante da susceptibilidade para intoxicação por OF (3,22,62,65).

3. Objetivos

Objetivo Geral

Investigar associação dos polimorfismos genéticos **rs1803274** (gene *BChE*) e **rs662 e rs854560** (gene *PON1*) com sintomatologia característica de exposição a agrotóxicos OF em trabalhadores rurais.

Objetivos Específicos

- Descrever a frequência das variáveis relacionadas aos sintomas característicos de exposição a agrotóxicos OF em trabalhadores rurais;
- Determinar a atividade da enzima BChE, indicador biológico de intoxicação por OF, em trabalhadores rurais;
- Analisar a associação entre a atividade da enzima BChE encontrada nos trabalhadores e os polimorfismos genéticos **rs1803274** (gene *BChE*) e **rs662 e rs854560** (gene *PON1*).

4. Metodologia

Este estudo é caracterizado como caso-controle, com abordagem transversal e faz parte da continuidade de um projeto de pesquisa “guarda-chuva” iniciado em 2013 pelo Núcleo de Pesquisa e Atenção à Saúde do Trabalhador (NUPAST), intitulado “Análise de indicadores de saúde e marcadores de risco à exposição a agrotóxicos nos trabalhadores das lavouras da laranja nas regiões de maior produção do estado de Sergipe”.

4.1. População alvo

Foram selecionados trabalhadores rurais adultos de áreas rurais da região Centro-Sul de Sergipe.

4.2. Cálculo amostral

O cálculo amostral teve por objetivo conseguir uma amostra mínima que fosse representativa para esta população, considerando a diversidade de propriedades estimada, um erro amostral de 5% e um intervalo de confiança de 95%.

A amostra é composta por 427 indivíduos que concordaram em participar do estudo, após o preenchimento do TCLE (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido).

4.3. Critérios de inclusão

- Trabalhadores rurais, homens e mulheres maiores de 18 anos.
- Trabalhadores rurais que tiveram contato direto e/ou indireto com o agrotóxico OF, independente do período de uso.

4.4. Critérios de exclusão

- Trabalhadores rurais que NÃO tiveram contato direto e/ou indireto com o agrotóxico OF.

4.5. Organização e operacionalização dos eventos de coleta

O evento de coleta foi realizado nas Unidades Básicas de Saúde na proximidade geográfica com a moradia dos trabalhadores rurais das regiões selecionadas.

O evento foi agendado aos sábados para evitar dias úteis e para não comprometer o trabalho do voluntário. Foram evitados sábados imediatamente anteriores ou posteriores a feriados para garantir adesão do máximo possível de voluntários.

4.6. Coleta de dados

A equipe participante da coleta de dados da pesquisa foi composta de alunos de graduação e alunos da pós-graduação, divididas em quatro estações:

I - Estação TCLE;

II - Estação de entrevista;

III - Estação de coleta de sangue.

A estação TCLE foi composta por alunos de graduação, cuja função foi garantir aos participantes a completa compreensão dos objetivos da pesquisa, das etapas a serem cumpridas, dos benefícios gerados e as considerações éticas do estudo. O documento TCLE, após aceitação pelo trabalhador, foi devidamente assinado. Em seguida, o mesmo foi efetivamente incluído na pesquisa e seguiu para as demais estações.

A segunda etapa do estudo com os trabalhadores agrícolas foi o preenchimento do questionário eletrônico, aplicados por pesquisadores treinados e calibrados que participavam do projeto. Foram abordados os aspectos sócio-demográficos destes trabalhadores, tais como idade, gênero, grau de instrução, local de residência, perfil socioeconômico, etnia e atividade profissional. A presença de sinais e sintomas que poderiam estar ligados com a intoxicação por agrotóxicos também foi contemplada no questionário, em uma abordagem simples, que fosse do entendimento do trabalhador. Através do auto-relato nos questionários, foi possível dividir os trabalhadores em dois grupos:

- G1 (226): Estudo - com sintomas característicos de exposição aos OF;

- G2 (201): Controle - sem sintomas característicos de exposição aos OF.

Em seguida os mesmos foram encaminhados para a coleta de sangue. Utilizando materiais esterilizados e descartáveis, e a metodologia de coleta à vácuo, profissionais devidamente capacitados realizaram as coletas de sangue em tubos contendo o anticoagulante EDTA, e tubos sem aditivos para obtenção de soro para a determinação da atividade enzimática da BChE.

O sangue foi coletado preferencialmente no sistema venoso antecubital, região anatômica de forma triangular, anterior ao cotovelo, limitada pelo músculo pronador redondo e pelo músculo braquiorradial. Entretanto, em caso de limitação anatômica do paciente, foi feita a coleta em outro vaso venoso em membro superior. As amostras foram levadas para processamento e análise nos laboratórios conveniados das prefeituras das cidades estudadas para a realização de exame laboratorial com o objetivo de determinar a atividade da BChE. Após a coleta de sangue foi oferecido um lanche aos trabalhadores participantes.

Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm, por 10 minutos, para facilitar a separação da série leucocitária, formada por células nucleadas, por possuírem material genético em seu interior.

Todos os participantes foram encaminhados para a estação de exame clínico durante uma segunda abordagem pela equipe onde receberam os resultados dos exames laboratoriais. Os trabalhadores que apresentarem alterações na atividade da BChE comprovadas pelos exames laboratoriais foram encaminhados para o profissional médico do trabalho para tratamento e acompanhamento, através do Centro de Referência em Saúde do Trabalhador (CEREST).

4.7. Determinação da atividade da Colinesterase Plasmática (BChE)

O método empregado para dosagem de colinesterase plasmática foi o cinético colorimétrico (Bioclin®). Os valores das colinesterases inferiores aos valores de referência (Homens: 5600 - 11200 U/L e para Mulheres: 4200 - 10800 U/L) são indicadores de uma exposição e/ou intoxicação por pesticidas inibidores de colinesterases, como os organofosforados.

4.8. Extração, purificação e quantificação do DNA.

A primeira etapa, foi a extração do DNA, consiste na lise das membranas biológicas e purificação do material genético, e foi realizada pela técnica de Extração por Coluna de Sílica da marca Invitrogen ®. Nesse tipo de extração, após a solução de lise ser adicionada a amostra, o DNA é liberado do envoltório nuclear, e se liga à coluna, que possui afinidade pelo mesmo. Uma vez preso à coluna de sílica, se realizam duas lavagens para purificar o material genético, de forma que no final do procedimento, só reste o DNA na amostra, sem os demais constituintes da célula ou possíveis contaminantes. Em seguida, uma substância eluente quebra a ligação entre o DNA e a coluna de sílica, e o material genético, então, está purificado e pronto para a segunda etapa.

Uma vez extraído e purificado, a próxima etapa foi a quantificação do DNA, através de espectrofotometria, que consiste na utilização de comprimentos de onda para a quantificação de volumes mínimos de DNA.

4.9. Real Time PCR

A técnica escolhida para avaliação da presença ou ausência dos SNPs foi o PCR em tempo real. A genotipagem das amostras foi realizada utilizando primers (oligonucleotídeos iniciadores) específicos para os SNPs pesquisados e sondas Taqman para marcar as reações com fluorescência. Os desenhos dos primers já estavam previamente desenvolvidos pela empresa Thermo Scientific ®, e foram adquiridos juntamente com as respectivas sondas, também previamente padronizadas. A sequência dos primers está representada no quadro 04. Os primers marcam a região de interesse que se deseja pesquisar no DNA estudado, possuindo uma sequência iniciadora para a direção 5' – 3' para o primer Forward, e outra para o primer Reverse, na direção 3'-5', já que as fitas têm que possuir nucleotídeos que sejam complementares. Uma vez reconhecendo a região complementar no DNA presente na amostra, o primer se liga à mesma, e a DNA polimerase, enzima responsável pela replicação do material genético, inicia o procedimento de duplicação das fitas.

Quadro 4. Sequência do desenho dos primers adquiridos para os SNPs.

SNP	Sequência dos Primers
rs1803274	AATCCTGCTTTCCACTCCCATTCTG[C/T]TTCATCAATATTTCTGTAAAATAT

rs662	TAAACCCAAATACATCTCCCAGGAT[C/T]GTAAGTAGGGGTCAAGAAAATAGTG
rs854560	GCCAGTCCATTAGGCAGTATCTCCA[A/T]GTCTTCAGAGCCAGTTTCTGCCAGA

Fonte: Thermo Scientific.

O fundamento da técnica de PCR em tempo real consiste justamente em simular *in vitro* a replicação do DNA que ocorre *in vivo*, com oscilações de temperatura que promovem a desnaturação da fita dupla de DNA ($\pm 95^{\circ}\text{C}$), formando duas fitas simples, o anelamento dessas fitas com os primers e a posterior extensão ($\pm 60^{\circ}\text{C}$), onde uma fita gerará duas outras fitas, e a cada ciclo, essa replicação ganha um caráter logarítmico. Ao final de 40 ciclos, teremos milhares de cópias do fragmento de DNA testado. A cada replicação, um sinal fluorescente é liberado pela sonda, que está acoplada ao primer, e esse sinal é captado pelo equipamento e transformado em informação alélica, que no caso deste estudo, é representada pela presença dos genótipos estudados. O equipamento utilizado foi o 7500 Standard da Thermo Scientific®.

4.10. Aspectos Éticos / Biossegurança

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Sergipe sob o número CAAE: 12988313.6.0000.5546, de acordo com a Resolução MS/CNS 466/ 2012 do Conselho Nacional de Saúde (CNS). Para a entrevista, cada paciente forneceu autorização prévia através de assinatura após consentimento livre e esclarecido. Todas as informações coletadas são confidenciais de modo que os nomes das pacientes entrevistadas não aparecem em nenhum relatório ou artigo.

As amostras de sangue dos pacientes receberam adequado armazenamento, seguindo protocolo próprio, cada qual contendo um código correspondente, somente acessado pelos pesquisadores responsáveis. Os questionários dos pacientes foram arquivados em local restrito, apenas disponibilizados para os pesquisadores responsáveis. A identidade dos pacientes foi devidamente preservada, uma vez que códigos foram utilizados para fins de rotulação.

4.11. Organização e tabulação dos dados coletados

Os dados coletados na estação de anamnese em formulários eletrônicos foram migrados eletronicamente para planilhas do tipo Microsoft® excel® 2011 for MAC versão 14.3.2 no formato (xlsx). Para migração dos dados coletados na

estação de coleta de sangue, onde obtivemos os resultados dos exames de sangue , posteriormente a coleta os valores obtidos foram tabulados em planilha do tipo Microsoft® Excel® 2011 for MAC versão 14.3.2 no formato (xlsx) utilizando dupla digitação e posterior “data compare”, desta forma checando a consistência da migração.

Este trabalho foi dividido entre as análises descritivas, análise de variáveis contínuas e categóricas, na qual foram analisados as características sociodemográficas e econômicas (faixa etária, gênero, cor da pele, local de residência, grau de instrução e classe socioeconômica - segundo o Critério de Classificação Econômica Brasil – CCEB, da Associação Brasileira de Empresas de Pesquisa – ABEP - APÊNDICE C), indicadores de sintomas característicos de intoxicação por OF, atividade da enzima BChE (dado categorizado) e genotipagem dos trabalhadores rurais para os SNPs estudados.

4.12. Análises estatísticas

A análise estatística foi realizada através dos softwares:

(1) IBM® - *Statistical Package for the Social Science* – SPSS® versão 21 – para iOS X. As variáveis categóricas foram expressas em números absolutos e percentual. Para teste de associação das variáveis categóricas, foi utilizado o teste Qui-Quadrado e Exato de Fischer. A variável contínua foi expressa em média $\pm$ desvio padrão. Para os testes dos modelos genéticos a regressão logística binária foi utilizada no Modelo Aditivo e o Teste Exato de Fisher e teste Qui-Quadrado nos Modelos Dominante e Recessivo.

(2) Haploview 4.2 onde foram calculadas as frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos estudados e o desequilíbrio de ligação entre os dois SPNs do gene PON1.

Em todos os testes o nível de significância adotado foi de 5% com intervalo de confiança de 95%.

5. RESULTADOS

A população estudada se caracterizou predominantemente por indivíduos do gênero masculino (72,4%), com média de idade de 40,96 anos ($\pm 12,64$ anos), e residem em sua maioria na zona rural (72,4%). Apesar da maioria relatar que tem pelo menos o ensino fundamental I completo, considerado, portanto, alfabetizado (54,6%), o percentual de analfabetos é representativo (45,4%), o que pode refletir o baixo grau de instrução desta população. Com relação ao perfil socioeconômico, 60,3% dos indivíduos relataram ter uma renda igual ou inferior a um salário mínimo, caracterizando-se como integrantes das classes menos privilegiadas. Quanto à cor da pele, 82,5% dos indivíduos se declararam pardos ou negros (Tabela 01).

Tabela 01. Frequência de distribuição absoluta e percentual dos trabalhadores rurais de acordo com as variáveis

		N	(%)
Gênero	Feminino	118	27,6
	Masculino	309	72,4
Local de Residência	Zona Rural	301	72,4
	Zona Urbana	115	27,6
Grau de Instrução	Não Alfabetizado	189	45,4
	Alfabetizado	227	54,6
Renda Familiar	≤ 1 salário mínimo	251	60,3
	>1 salário mínimo	165	39,7
Cor de Pele	Pardos / Negros	343	82,5
	Outros	73	17,5

Os trabalhadores rurais foram avaliados quanto aos indicadores de saúde, em referência aos principais sintomas originados da exposição aos OFs. A fraqueza muscular foi o sintoma mais frequente (n=193) dentre os relatados, seguido em ordem decrescente por tremor noturno (n= 88) e convulsões (n=15) (Tabela 02).

Tabela 02. Frequência de distribuição absoluta e relativa dos trabalhadores rurais, com relação à presença de sintomas.

		N	(%)
Fraqueza Muscular	Sim	193	46,4
	Não	223	53,6
Tremor Noturno	Sim	88	21,2
	Não	328	78,8
Convulsões	Sim	15	3,6
	Não	401	96,4

A presença de sintomas foi mais frequente nos trabalhadores que residem na zona rural (56,5% x 43,5%) com **OR=1,30 (1,03 - 1,64)** sendo o local de residência rural associado à presença de sintomas (**p=0,018**). Quanto a presença de sintomas e o grau de instrução foi encontrada uma associação estatisticamente significativa (**p=0,018**) e um **OR=1,66 (1,12-2,45)**, como descrito na Tabela 03.

Tabela 03: Tabela de associação entre as variáveis socioeconômicas e a presença de sintomatologia característica da exposição ao OF.

		G1(n=220)		G2 (n=196)		Valor de p	Odds Ratio
		N	(%)	N	(%)		
Gênero	Feminino	59	50	59	50	0,454(*)	(-)
	Masculino	167	54	142	46		
Local de Residência	Zona Rural	170	77,3	131	66,8	0,018(*)	1,30 (*) (1,03-1,64)
	Zona Urbana	50	22,7	65	33,2		
Grau de Instrução	Não Alfabetizado	87	39,5	102	52	0,011(*)	1,66 (*) (1,12-2,45)
	Alfabetizado	133	60,5	94	48		
Renda Familiar	≤ 1 salário mínimo	139	63,2	112	57,1	0,209 (*)	(-)
	>1 salário mínimo	81	36,8	84	42,9		
Cor de Pele	Pardos / Negros	180	53,1	163	46,9	0,719 (*)	(-)
	Outros	40	54,7	33	45,3		

(*) Pearson qui-Quadrado (p<0,05).

Apenas 14 indivíduos apresentaram a atividade da enzima BChE reduzida, correspondendo a 4% da população total avaliada. Nessa associação não foram encontradas diferenças significantes entre os grupos, apesar de 50% dos trabalhadores em que a atividade enzimática estava reduzida relatarem presença da sintomatologia (Tabela 04).

Tabela 04. Frequência de distribuição absoluta e relativa dos trabalhadores rurais, com relação à determinação da atividade da colinesterase plasmática (BChE).

Atividade de BChE	G1(Estudo)		G2(Controle)		Valor de <i>p</i>
	N	(%)	N	(%)	
Normal	182	54,5	152	45,5	0,741
Reduzida	7	50	7	40	

(*) Pearson qui-Quadrado ($p < 0,05$).

A comparação entre as frequências alélicas da amostra e da população Yorubá, escolhida como referência pelo perfil de ancestralidade (63,64,66,67) dos trabalhadores rurais deste estudo, estão representadas na Tabela 05.

Tabela 05. Distribuição das frequências alélicas da amostra e da população Yorubá.

	Alelos	Frequência Alélica	Frequência Alélica (Yorubá)
rs1803274	T	0,18	0,16
	C	0,82	0,84
rs662	C	0,48	0,21
	T	0,52	0,79
rs854560	T	0,7	(*)
	A	0,3	(*)

(*) Não foi encontrado frequência para esse rs na população Yorubá

Os polimorfismos nos genes BCHE (rs1803274) e PON1 (rs662 e rs854560) apresentaram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Os alelos mais frequentes no grupo que apresentou sintomas característicos de intoxicação por OF para cada polimorfismo foram: Alelo T para o polimorfismo rs662; Alelo T para o polimorfismo rs 854560 e Alelo C para o polimorfismo rs 1803274. Para os dois SNPs do gene PON1(rs662 e o rs854560) o desequilíbrio de ligação foi $r^2 = 17$.

Os resultados da genotipagem dos trabalhadores rurais foram representados em valores percentuais de frequência dos genótipos. Com relação ao rs1803274, SNP da BChE, a maioria dos integrantes desta pesquisa não apresentou o alelo polimórfico, correspondendo a 64,9% de genótipos apenas com o alelo selvagem. Ao proceder a genotipagem para o rs662, verificou-se a presença de 49,8% de indivíduos heterozigotos para este polimorfismo, e para o rs854560, os resultados mostraram maior frequência de indivíduos portadores do alelo selvagem em homozigose (48,1%), seguido do genótipo heterozigoto (41,3%).

A associação entre os genótipos e os grupos estudo e controle está descrita pela Tabela 06, utilizando o modelo aditivo-dominante-recessivo. Onde verificou-se uma relação estatisticamente significativa para o rs1803274 ($p=0,041$) e um **OR= 1,53 (1,02-2,29)**, no modelo recessivo (Tabela 06).

Tabela 06. Associação entre os genótipos nos modelos Aditivo-Dominante-Recessivo e a presença/ ausência de sintomas.

Tag SNP	Alelo associado	Modelo Genético	Alelos	G1 N(%)	G2 N(%)	valor de p	Odds Ratio
rs1803274	C	Aditivo	TT	7(3,2)	9(4,6)	0,121 ^(§)	(-)
			CT	60(27,4)	69(35,6)		
			CC	152(69,4)	116(69,8)		
		Dominante	TT	7(3,2)	9(4,6)	0,448 (*)	(-)
			CT+CC	212(96,8)	185(95,4)		
		Recessivo	TT+CT	67(30,6)	78(40,2)	0,041(*) (**)	1,525 (*) (1,02-2,30)
			CC	152(69,4)	116(59,8)		
rs662	T	Aditivo	CC	44(19,6)	49(24,6)	0,431 ^(§)	(-)
			CT	114(50,7)	97(48,7)		
			TT	67(29,8)	53(26,6)		
		Dominante	CC	44(19,6)	49(24,6)	0,208 (*)	(-)
			CT+TT	181(80,4)	150(75,4)		
		Recessivo	CC+CT	158(70,2)	146(73,4)	0,473 (*)	(-)
			TT	67(29,8)	53(26,6)		
rs854560	T	Aditivo	AA	101(45,9)	99(50,5)	0,230 ^(§)	(-)
			AT	99(45,0)	73(37,2)		
			TT	20(9,1)	24(12,2)		
		Dominante	AA	101(45,9)	99(50,5)	0,348 (*)	(-)
			AT+TT	119(54,1)	97(49,5)		
		Recessivo	AA+AT	200(90,9)	172(87,8)	0,296(*)	(-)
			TT	20(9,1)	24(12,2)		

(*) Pearson qui-Quadrado

(§) Modelo de Regressão Logística Binária

Este estudo, também testou a associação entre os genótipos e os sintomas de forma independente. A fraqueza muscular apresentou associação significativa com o polimorfismo rs1803274, no modelo aditivo para o alelo associado C ($p=0,021$) e no modelo dominante ($p=0,014$) com um *Odds Ratio* de 5,44 (1,20 – 24,63) (Tabela 07).

Tabela 07. Associação entre os genótipos nos modelos Aditivo-Dominante-Recessivo e o sintoma “Fraqueza Muscular”.

Tag SNP	Alelo associado	Modelo Genético	Alelos	N(%) Com Fraqueza Muscular	N(%) Sem Fraqueza Muscular	valor de p	Odds Ratio
rs1803274	C	Aditivo	TT	2(1,1)	12(5,6)	0,021^(§)	(-)
			CT	53(28,3)	71(32,9)		
			CC	132(70,6)	133(61,6)		
		Dominante	TT	2(1,1)	12(5,6)	0,014^(*)	5,441^(*) (1,20-24,6)
			CT+CC	185(98,9)	204(94,4)		
		Recessivo	TT+CT	55(29,4)	83(38,4)	0,057 ^(*)	(-)
rs662	T	Aditivo	CC	41(21,4)	51(23,0)	0,732 ^(§)	(-)
			CT	100(52,1)	107(48,2)		
			TT	51(26,6)	64(26,8)		
		Dominante	CC	41(21,4)	51(23,0)	0,693 ^(*)	(-)
			CT+TT	151(78,6)	171(77,0)		
		Recessivo	CC+CT	141(73,4)	158(71,2)	0,608 ^(*)	(-)
rs854560	T	Aditivo	TT	51(26,6)	64(28,8)	0,303 ^(§)	(-)
			AA	85(45,2)	110(50,7)		
			AT	86(45,7)	83(38,2)		
		Dominante	TT	17(9,0)	24(11,1)	0,271 ^(*)	(-)
			AA	85(45,2)	110(50,7)		
		Recessivo	AT+TT	103(54,8)	107(49,3)	0,502 ^(*)	(-)
		Aditivo	AA+AT	171(91,0)	193(88,9)	0,502 ^(*)	(-)
			TT	17(9,0)	24(11,1)		
			TT	17(9,0)	24(11,1)		
		Dominante	AA	85(45,2)	110(50,7)	0,271 ^(*)	(-)
			AT+TT	103(54,8)	107(49,3)		
		Recessivo	AA+AT	171(91,0)	193(88,9)	0,502 ^(*)	(-)

(*) Pearson qui-Quadrado

(§) Modelo de Regressão Logística Binária

(**) Odds Ratio: 5,441.

Tremor noturno e convulsão não apresentaram associação com nenhum dos genótipos em nenhuma das condições testadas como descrito nas Tabelas 08 e 09.

Tabela 08. Associação entre os genótipos nos modelos Aditivo-Dominante-Recessivo e o sintoma “Tremor Noturno”.

Tag SNP	Alelo mais frequente	Modelo Genético	Alelos	N(%) TN Sim	N(%) TN Não	valor de p
rs1803274	C	Aditivo	TT	3(3,5)	11(3,5)	0,704 ^(§)
			CT	23(27,1)	101(31,8)	
			CC	59(69,4)	206(64,8)	
		Dominante	TT	3(3,5)	11(3,5)	1,000 ^(**)
			CT+CC	82(96,5)	307(96,5)	
		Recessivo	TT+CT	26(30,6)	112(35,2)	0,424 ^(*)
rs662	T	Aditivo	CC	59(69,4)	206(64,8)	0,288 ^(§)
			CT	14(16,1)	78(23,9)	
			TT	48(55,2)	159(48,6)	
		Dominante	CC	14(16,1)	78(23,9)	0,122 ^(*)
			CT+TT	73(83,9)	249(76,1)	
		Recessivo	CC+CT	62(71,3)	237(72,5)	0,822 ^(*)
rs854560	T	Aditivo	TT	25(28,7)	90(27,5)	0,915 ^(§)
			AA	43(50)	152(47,6)	
			AT	35(40,7)	134(42,1)	
		Dominante	TT	8(9,3)	33(10,3)	0,699 ^(*)
			AA	43(50)	152(47,6)	
		Recessivo	AT+TT	43(50)	167(52,4)	0,776 ^(*)
		Recessivo	AA+AT	78(90,7)	286(89,7)	0,776 ^(*)
			TT	8(9,3)	33(10,3)	

(*) Pearson qui-Quadrado

(**) Exato de Fisher

(§) Modelo de Regressão Logística Binária

Tabela 09. Associação entre os genótipos nos modelos Aditivo-Dominante-Recessivo e o sintoma “Convulsão”.

Tag SNP	Alelo mais frequente	Modelo Genético	Alelos	Convulsão Sim N(%)	Convulsão Não N(%)	valor de p
rs1803274	C	Aditivo	TT	0(0)	14(3,6)	0,264 ^(§)
			CT	2(14,3)	122(31,4)	
			CC	12(85,7)	253(65,0)	
		Dominante	TT	0(0)	14(3,6)	1,000(**)
			CT+CC	14(100)	375(96,4)	
		Recessivo	TT+CT	2(14,3)	136(35)	0,153(**)
rs662	T	Aditivo	CC	3(21,4)	89(22,3)	0,410 ^(§)
			CT	5(35,7)	202(50,5)	
			TT	6(42,9)	109(27,3)	
		Dominante	CC	3(21,4)	89(22,3)	1,000(**)
			CT+TT	11(78,6)	311(77,8)	
		Recessivo	CC+CT	8(57,1)	291(72,8)	0,227(**)
rs854560	T	Aditivo	TT	6(42,9)	109(27,2)	
		Aditivo	AA	7(46,7)	188(48,2)	0,868 ^(§)
			AT	7(46,7)	162(41,5)	
			TT	1(6,6)	40(10,3)	
		Dominante	AA	7(46,7)	188(48,2)	0,907(*)
			AT+TT	8(53,3)	202(51,8)	
		Recessivo	AA+AT	14(93,3)	350(89,7)	1,000(*)
			TT	1(6,7)	40(10,3)	

(*) Pearson qui-Quadrado

(**) Exato de Fisher

(§) Modelo de Regressão Logística Binária

A atividade de BChE também foi relacionada com os genótipos, e apresentou associação estatisticamente significativa para o SNP rs662, polimorfismo presente no gene da PON1 no modelo genético recessivo. Não houve diferença estatística entre este parâmetro e os sintomas avaliados de forma isolada (Fraqueza muscular, Tremor Noturno e Convulsões), como apresentado na Tabela 10.

Tabela 10. Associação entre os genótipos nos modelos Aditivo-Dominante-Recessivo e atividade da BChE.

Tag SNP	Alelo associado	Modelo Genético	Alelos	BChE Normal	BChE Reduzida	valor de p	Odds Ratio
rs1803274	C	Aditivo	TT	13(4,0)	0(0)	0,085 ^(§)	(-)
			CT	96(29,8)	8(57,1)		
			CC	213(66,1)	6(42,9)		
		Dominante	TT	13(4,0)	0(0)	1,000 (**)	(-)
			CT+CC	309(96,0)	14(100)		
		Recessivo	TT+CT	109(3,9)	8(57,1)	0,088(**)	(-)
rs662	T	Aditivo	CC	213(66,1)	6(42,9)		
		Aditivo	CT	73(21,9)	2(14,3)	0,093 ^(§)	(-)
			TT	161(48,3)	4(28,6)		
		Dominante	CC	73(21,9)	2(14,3)	0,742(**)	(-)
			CT+TT	260(78,1)	12(85,7)		
		Recessivo	CC+CT	234(70,3)	6(42,9)	0,039 (**)	3,152 (*) (1,07-9,32)
rs854560	T	Aditivo	TT	99(29,7)	8(57,1)		
		Aditivo	AA	161(49,8)	7(50)	0,912 ^(§)	(-)
			AT	128(39,6)	6(42,9)		
			TT	34(10,5)	1(7,1)		
		Dominante	AA	161(49,8)	7(50)	0,991(*)	(-)
			AT+TT	162(50,2)	7(50)		
		Recessivo	AA+AT	289(89,5)	13(92,9)	1,000(*)	(-)
			TT	34(10,5)	1(7,1)		

(*) Pearson qui-Quadrado

(**) Exato de Fisher

(§) Modelo de Regressão Logística Binária

6. Discussão

A população estudada mostrou um perfil semelhante a outros estudos com trabalhadores rurais (1,22,30), composto em sua maioria por trabalhadores do gênero masculino. No entanto, a presença de sintomas relacionados a exposição a OF, verificado entre homens e mulheres não demonstrou diferença estatisticamente significativa.

A faixa etária mais frequente corresponde a de adultos jovens, com média de idade de 40,96 anos ($\pm 12,64$ anos) onde verifica-se a preferência pela mão de obra na qual há um maior desempenho físico devido às atividades desenvolvidas na agricultura.

O local de residência foi associado à presença de sintomas ($p=0,018$), uma vez que a maioria dos trabalhadores rurais dessa amostra moram na zona rural e a sintomatologia foi mais frequente nesse grupo com **OR=1,30 (1,03 - 1,64)**. Esta situação é resultado da agricultura familiar predominante da região centro-sul de Sergipe. Os resultados estão de acordo com um estudo anterior (68), que ao avaliar uma população jamaicana de trabalhadores rurais, encontrou uma associação significativa para os indivíduos que moravam mais próximo do local de trabalho. Esta relação se deve, provavelmente, ao fato de que, uma vez aplicados nas lavouras, os OF podem se dispersar, quando veiculados pelo ar, por exemplo (69).

Neste estudo, observou-se que a maioria dos integrantes foi considerado alfabetizado (54,6%). Este achado diverge de trabalhos anteriores (1,30,39,68), onde a população estudada é majoritariamente analfabeta. A porcentagem de analfabetos encontrada (45,4%), pode refletir o baixo nível de instrução desta população. A associação dessa variável e os sintomas foi estatisticamente significativa ($p=0,011$), com **OR:1,66(1,12-2,45)**, essa característica pode estar relacionada à dificuldade de interpretação dos dados nos rótulos dos OF e, consequentemente, o mau uso deles (69).

Entre os indivíduos considerados alfabetizados muitos relataram ter apenas o ensino fundamental I completo, o que demonstra que mesmo dentre os alfabetizados, podemos encontrar deficiências cognitivas que impedem a correta assimilação de informações e correto procedimento (70,71). A UNESCO (United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization) agrupa estes indivíduos

em uma categoria denominada “Analfabetos Funcionais”, onde o nível de escolaridade dos mesmos está abaixo de quatro anos (72).

Com relação a classe socioeconômica dos trabalhadores rurais que compõem a amostra do estudo, a maioria deles pertence às classes menos favorecidas, com uma renda igual ou inferior a um salário mínimo. O papel que os indicadores socioeconômicos desempenham sobre a exposição a agrotóxicos, apontam evidências acerca de sua relevância para a avaliação de riscos do uso de pesticidas no meio rural. Apesar de outros estudos afirmarem a relação desta variável com intoxicações por OF (34,39), não foi encontrada associação com relevância estatística para esta variável.

A população estudada é na sua maioria negro ou pardo (82,5%). Não houve associação significativa quando foi testada a associação desta variável e a sintomatologia característica de intoxicação por OF, resultado similar ao encontrado em outro estudo (35). Por conta da predominância de negros e pardos na região nordeste do Brasil, baseado em estudos anteriores em nível nacional (66,67), a população de referência escolhida para comparação de frequência genotípica e alélica foi a Yorubá, representativa da origem africana.

Os relatos de sintomatologia abordaram três sintomas relacionados ao sistema nervoso central, dentre os quais a fraqueza muscular apresentou a maior frequência (193/46,6%), semelhante a um estudo com uma população do sul do Brasil (30). A sensação de fraqueza muscular está intimamente ligada à fisiopatologia da intoxicação por OF, onde não há relaxamento da sinapse nervosa, visto que a acetilcolina residual não é hidrolisada da maneira adequada (2). A hiperestimulação na fenda sináptica confere a sensação de que o músculo está sempre em atividade, traduzida em Fraqueza Muscular (9,17).

Uma análise em nível molecular explica melhor a predominância da fraqueza como principal sintoma. A redução na atividade das colinesterases contribui para a redução na ativação das caspases, enzimas que liberam o citocromo C da mitocôndria para o citosol, iniciando o processo de apoptose. Logo, as células que deveriam passar por este processo de morte programada permanecem funcionais, mesmo de forma deficiente. Consequentemente, estas células geram baixa quantidade de energia (ATP – Adenosina Trifosfato) e de radicais livres decorrentes da respiração celular. A baixa energia, associada à presença de células velhas no

tecido muscular conferem a sensação de fraqueza nos indivíduos expostos à OF (73).

Tremor noturno, espasmos durante o sono, aparece também como um dos sintomas característicos, porém em um número menor de trabalhadores (88/21,2%). A convulsão foi o sintoma com a menor frequência entre os auto-relatos dos entrevistados (15/3,6%). Uma provável causa para estes índices é o fato de estes sintomas se apresentarem de forma inconsciente, o que dificulta o aparecimento por auto-relato.

A atividade de BChE esteve alterada em apenas 14 trabalhadores rurais, não apresentando associação significativa com presença de sintomas característicos de intoxicação por OF. Esse achado talvez se deva ao fato da BChE ser um marcador de intoxicação aguda, e nesse estudo não foi levado em consideração o tempo do último contato com o OF no momento da coleta de sangue. O resultado obtido nessa população pode indicar a necessidade de um estudo longitudinal, que realize o monitoramento da BChE no período pré e pós exposição, para se obter os valores basais da colinesterase do trabalhador rural, como realizado em um outro estudo(35). Segundo estudos, o valor de referência com intervalos muito grandes de normalidade podem mascarar uma alteração de atividade de BChE, caso não se tenha um valor basal deste parâmetro (9,23,34). A representatividade dos dados pode melhorar de forma significativa a visualização da real situação destes indivíduos.

Para o rs1803274, temos que o alelo C foi o mais frequente, tanto no grupo estudo quanto no grupo controle, sendo que a maior parte dos trabalhadores rurais apresentou este alelo em homozigose (64,9%). Achados semelhantes foram vistos em outros estudos na Colômbia e Espanha (9,45,57). A ordem de frequência genotípica em todos estes estudos é de CC>CT>TT, similar aos achados do presente estudo, e que reforçam a hipótese de dominância observada pelo alelo C em todas as populações destes estudos.

Sanchez, em seu trabalho com adultos expostos a inibidores de colinesterase na Colômbia, achou em 84% de seus genótipos a presença do alelo C, e demonstrou a relação entre o genótipo e a atividade da enzima, encontrando uma associação significativa ($p < 0,001$)(9). Gómez-Martin, em seu estudo na Espanha, usou a população européia (caucasiana) como referência, pelo seu perfil de

ancestralidade, e ainda assim encontrou a mesma frequência alélica que o presente estudo ($C=0,82$; $T=0,18$)(57). Os resultados de frequência alélica encontrados no presente estudo reforçam a hipótese do caráter dominante do alelo C, nas diversas populações estudadas (9).

No cruzamento (CT+TT vs CC - modelo recessivo para o alelo C), o genótipo CC foi associado a sintomatologia (**$p=0,041$**), com **OR= 1,53 (1,02-2,29)**. A maioria dos estudos associa esta variável com a atividade da enzima BChE, não com sintomatologia propriamente dita(17,18,24,25).

Com relação ao rs662, o alelo T foi o mais frequente, se apresentando em heterozigose para a maioria do grupo estudo (50,7%), seguindo a seguinte sequência: CT>TT>CC. Dois estudos, um na Turquia e outro na China, demonstram outra ordem de apresentação genotípica (TT>CT>CC), provavelmente pelos diferentes perfis de ancestralidade que estas populações possuem em relação a brasileira. Porém, o alelo T é o mais frequente, tanto neste estudo, quanto nos continentes europeu e asiático.(26,54).

Não foi encontrada associação entre a presença do polimorfismo rs662 e a sintomatologia característica de intoxicação por OF. Resultado semelhante foi encontrado por Hernandez *et al* em um estudo realizado com trabalhadores rurais na Espanha ($p=0,994$) (65). Nesse mesmo estudo, foi testado a associação da sintomatologia e outros três polimorfismos, sem resultados estatisticamente significantes. Um estudo na China, com uma população exposta ao OF, também não encontrou associação significativa entre este SNP e os sintomas ($p= 0,4996$)(26).

Com isso, pode-se inferir que o rs662 modula a resposta ao OF dependente de substrato, conforme apresentado em um estudo realizado em Cingapura(27), com trabalhadores expostos à OF, onde foi testada a eficiência da enzima PON1 para os dois substratos, o paraoxon (metabólito do paration – inseticida e acaricida OF) e o diazoxon (metabólito do diazinon – inseticida OF). Para o paraoxon, os alelos R (rs662) e do alelo L (rs854560), ambos representando os alelos polimórficos, aumentaram a atividade enzimática, enquanto que para o diazoxon foi o inverso: o alelo Q (rs662) e o alelo M (rs854560), que representam os alelos selvagens, foram os responsáveis pelo aumento da atividade da Paraoxonase. Porém, apesar dos achados perante os substratos, estes SNPs não parecem estar associados com a presença de sintomas.(27) .

O alelo T foi associado à sintomatologia no polimorfismo rs854560, e o alelo A foi o mais frequente, apresentando a ordem de frequência genotípica de AA>AT>TT. Frequência semelhante foi encontrada em uma população de chineses (26), apesar do adverso perfil de ancestralidade entre as populações. Os dois estudos, ao correlacionar este SNP com exposição à OF e, consequentemente, à manifestação de sintomas, não encontraram relação significativa. Um outro trabalho desenvolvido na Espanha(65), com trabalhadores rurais (n= 102) mostrou a associação entre sintomas e genótipos, porém, não foi encontrada associação significativa entre as variáveis ($p = 0,989$) (65).

Não foram encontrados, até o momento, outros estudos em que testaram a associação entre os sintomas de forma independente e os genótipos. Nesse estudo, as variáveis correspondentes aos sintomas foram testadas separadamente, sendo que a fraqueza muscular, apresentou associação estatisticamente significativa com o rs1803274, SNP da BChE, no modelo aditivo para o alelo associado C ($p= 0,021$) e no modelo dominante ($p= 0,014$) com um **Odds Ratio** de **5,44 (1,20 – 24,63)**, aumentando a chance desses indivíduos para a presença de fraqueza muscular. Esta relação fica evidenciada pela divisão satisfatória entre os grupos com e sem fraqueza muscular (193 e 223, respectivamente), o que torna a análise estatística mais representativa neste contexto. O tremor noturno e as convulsões não estão com grupos pareados, devido à dificuldade de obter esses dados por auto-relato (sintomas inconscientes), o que pode ter atuado como fator de confusão para estes dois parâmetros, prejudicando a análise efetiva dos dados. Fraqueza muscular então, se apresentou como um parâmetro eficiente para correlacionar com o genótipo da BChE, concordando com um estudo anterior que defende o efeito aditivo com predominância do modelo dominante para este polimorfismo (9).

Nessa população de trabalhadores rurais quando foi analisada a associação entre a atividade de BChE e os genótipos, essa foi estatisticamente significativa para o polimorfismo rs662 (gene *PON1*), no modelo recessivo ($p = 0,039$) e o **OR= 3,152 (1,07 – 9,32)** para o genótipo TT e a atividade de BChE diminuída. Em outras palavras, quem apresenta este genótipo tem maior probabilidade de apresentar redução da atividade da BChE. Como a Paraoxanase está envolvida no processo de hidrólise dos OF, podemos inferir que modificações em sua estrutura, como por exemplo, um polimorfismo, compromete seu desempenho fisiológico. Uma vez que os OF não estão sendo metabolizados corretamente, vai haver ligação destes

compostos com a enzima BChE, e como consequência, este indivíduo apresentará níveis reduzidos de atividade enzimática.

Estudos adicionais que consideram a abordagem de *tag SNPs* de outros genes candidatos são necessários para entender melhor a influência genética associada à intoxicação por OF e seus sintomas, assim como a necessidade de um estudo longitudinal, que monitore a BChE no período pré e pós exposição, para se obter os valores basais da colinesterase do trabalhador rural exposto aos OF.

7. CONCLUSÃO

Os resultados demonstram que os fatores intrínsecos (SNPs) e extrínsecos (local de residência) avaliados podem modular o processo de intoxicação por OF, aumentando ou reduzindo a susceptibilidade dos indivíduos envolvidos. O polimorfismo rs1803274 (gene *BChE*), no modelo genético recessivo, apresentou uma associação estatisticamente significativa quando relacionado à sintomatologia característica de intoxicação por OF nos trabalhadores rurais. Avaliado de forma independente, a fraqueza muscular se destacou como maior representatividade dentre os sintomas, associada ao SNP rs1803274 nos modelos aditivo e dominante.

A atividade de BChE esteve diminuída em apenas 14 trabalhadores rurais, não apresentando associação significativa com presença de sintomas característicos de intoxicação por OF. Porém, quando foi testada a associação entre a atividade de BChE e os genótipos, essa foi estatisticamente significativa para o rs662 (gene *PON1*), no modelo recessivo.

Um estudo de caráter longitudinal poderá expressar melhor esta relação, correlacionando com os valores basais da BChE e estimando a perda de atividade pós-exposição ao OF. Assim como, a análise de SNPs de outros genes candidatos são necessários para entender melhor o fundo genético relacionado à intoxicação por OF.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hinson A, Dossou F, Hountikpo H, Lawin H, Koudafoke A, Fayomi B, et al. Risk Factors of Pesticide Poisoning and Pesticide Users' Cholinesterase Levels in Cotton Production Areas: Glazoué and Savè Townships, in Central Republic of Benin. *Environ Health Insights* [Internet]. 2017;11(0). Available from: <http://insights.sagepub.com/risk-factors-of-pesticide-poisoning-and-pesticide-users-cholinesterase-article-a6296>
2. Worek F, Wille T, Koller M, Thiermann H. Toxicology of organophosphorus compounds in view of an increasing terrorist threat. *Arch Toxicol*. 2016;90(9):2131–45.
3. Lozano-Paniagua D, Gómez-Martín A, Gil F, Parrón T, Alarcón R, Requena M, et al. Activity and determinants of cholinesterases and paraoxonase-1 in blood of workers exposed to non-cholinesterase inhibiting pesticides. *Chem Biol Interact* [Internet]. 2016;259:160–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2016.04.008>
4. Gonzalez V, Huen K, Venkat S, Pratt K, Xiang P, Harley KG, et al. Cholinesterase and paraoxonase (PON1) enzyme activities in Mexican–American mothers and children from an agricultural community. *J Expo Sci Environ Epidemiol* [Internet]. 2012;22(6):641–8. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/jes.2012.61>
5. Naksen W, Prapamontol T, Mangklabruks A, Thavornnyutikarn P, Srinual N, Panuwet P, et al. Associations of maternal organophosphate pesticide exposure and PON1 activity with birth outcomes in SAWASDEE birth cohort, Thailand. *Environ Res*. 2016;142:288–96.
6. Bochner R. Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas SINITOX e as intoxicações humanas por agrotóxicos no Brasil. *Cien Saude Colet* [Internet]. 2007;12(1):73–89. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-81232007000100012&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt
7. Santana RAL de, Bochner R, Guimarães MCS. Sistema nacional de informações tóxico-farmacológicas: o desafio da padronização dos dados.

- Ciência & Saúde Coletiva [Internet]. 2011;16:1191–200. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-81232011000700051&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt%5Cnhttp://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_pdf&pid=S1413-81232011000700051&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt
8. Limn JS, Moreira JC, Jacob SC, Araújo AJ, Monassn MC, Markowitz S. Riscos coletivos e impacto do uso de agrotóxicos sobre a saúde humana e ambiental : um estudo piloto de saúde ocupacional * Collective risks and the impact of the use of pesticides about human and environmental health : a pilot study of occupational health. 2002;
 9. Sánchez LH, Medina OM, Gómez G, González CI, Giores-Vargas Ó. Laboratory genetic-based reference values for cholinesterase activity in a Colombian population: A step forward in personalized diagnostics. Biomédica [Internet]. 2015;35:20–9. Available from: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-41572015000500003&lang=pt
 10. Worek F, Koller M, Thiermann H, Szinicz L. Diagnostic aspects of organophosphate poisoning. Toxicology. 2005;214(3):182–9.
 11. Akgür SA, Öztürk P, Solak I, Moral AR, Ege B. Human serum paraoxonase (PON1) activity in acute organophosphorous insecticide poisoning. Forensic Sci Int. 2003;133(1–2):136–40.
 12. Mackness, Mike; Mackness B. HUMAN PARAOXONASE-1 (PON1): GENE STRUCTURE AND EXPRESSION, PROMISCUOUS ACTIVITIES AND MULTIPLE PHYSIOLOGICAL ROLES. Gene. 2016;567(1):12–21.
 13. Nicolopoulou-Stamati P, Maipas S, Kotampasi C, Stamatis P, Hens L. Chemical Pesticides and Human Health: The Urgent Need for a New Concept in Agriculture. Front Public Heal [Internet]. 2016;4(July):1–8. Available from: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fpubh.2016.00148/abstract>
 14. Balasubramanian SP, Cox A, Brown NJ, Reed MW. Candidate gene polymorphisms in solid cancers. European Journal of Surgical Oncology. 2004;
 15. Jasiecki J, Jońca J, Żuk M, Szczoczarz A, Janaszak-Jasiecka A, Lewandowski

- K, et al. Activity and polymorphisms of butyrylcholinesterase in a Polish population. *Chem Biol Interact* [Internet]. 2016;259:70–7. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009279716301533>
16. Negrão AB, Pereira AC, Guindalini C, Santos HC, Messas GP, Laranjeira R, et al. Butyrylcholinesterase genetic variants: Association with cocaine dependence and related phenotypes. *PLoS One*. 2013;8(11):8–13.
 17. Lockridge O, Norgren RB, Johnson RC, Blake TA. Naturally Occurring Genetic Variants of Human Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase and Their Potential Impact on the Risk of Toxicity from Cholinesterase Inhibitors. *Chem Res Toxicol*. 2016;29(9):1381–92.
 18. Bono GF, Simão-Silva DP, Batistela MS, Josviak ND, Dias PFR, Nascimento GA, et al. Butyrylcholinesterase: K variant, plasma activity, molecular forms and rivastigmine treatment in Alzheimer's disease in a Southern Brazilian population. *Neurochem Int* [Internet]. 2015;81:57–62. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuint.2014.12.009>
 19. Lando G, Mosca A, Bonora R, Azzario F, Penco S, Marocchi A, et al. Frequency of butyrylcholinesterase gene mutations in individuals with abnormal inhibition numbers: an Italian-population study. *Pharmacogenetics* [Internet]. 2003;13(5):265–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12724618>
 20. You T, Lv J, Zhou L. PON1 Q192R and L55M polymorphisms and organophosphate toxicity risk: a meta-analysis. *DNA Cell Biol* [Internet]. 2013;32(5):252–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23590198>
 21. Furlong CE, Cole TB, Jarvik GP, Pettan-Brewer C, Geiss GK, Richter RJ, et al. Role of paraoxonase (PON1) status in pesticide sensitivity: Genetic and temporal determinants. *Neurotoxicology*. 2005;26(4 SPEC. ISS.):651–9.
 22. Hernández AF, Gil F, Lacasaña M, Rodríguez-Barranco M, Tsatsakis AM, Requena M, et al. Pesticide exposure and genetic variation in xenobiotic-metabolizing enzymes interact to induce biochemical liver damage. *Food Chem Toxicol*. 2013;61:144–51.

23. Marsillach J, Costa LG, Furlong CE. Paraoxonase-1 and Early-Life Environmental Exposures. *Ann Glob Heal*. 2016;82(1):100–10.
24. Kurdyukov I, Rodionov G, Radilov A, Babakov V. Genotyping single-nucleotide polymorphisms of human genes involved in organophosphate detoxification by high-resolution melting. *Anal Bioanal Chem*. 2014;406(21):5087–92.
25. Wang Z, Wang X, Wang J. Butyrylcholinesterase K Variant and Alzheimer ' s Disease Risk : A Meta-Analysis META-ANALYSIS. 2015;1408–13.
26. Zhang X, Sui H, Li H, Zheng J, Wang F, Li B, et al. Paraoxonase activity and genetic polymorphisms in northern Han Chinese workers exposed to organophosphate pesticides. *Exp Biol Med [Internet]*. 2014;239(2):232–9. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1535370213513983>
27. Chia SE, Mohamed Ali S, Yap PHE, Gan L, Ong YB, Chia KS. Distribution of PON1 polymorphisms-PON1Q192R and PON1L55M among Chinese, Malay and Indian males in Singapore and possible susceptibility to organophosphate exposure. *Neurotoxicology*. 2009;30(2):214–9.
28. Ferreira JVR, Peckle BA, Silva AS da, Gomes A da S, Santana VM, Direito ICN. Pesticidas aplicados na lavoura e o risco à saúde pública: uma revisão da literatura. *Cad UniFOA*. 2014;(24):85–94.
29. Abreu PHB de, Alonzo HGA. Trabalho rural e riscos à saúde: uma revisão sobre o “uso seguro” de agrotóxicos no Brasil. *Cien Saude Colet [Internet]*. 2014;19(10):4197–208. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-81232014001004197&lng=pt&nrm=iso&tlng=en
30. Nerilo SB, Martins FA, Nerilo LB, Salvadego VEC, Endo RY, Rocha GHO, et al. Pesticide use and cholinesterase inhibition in small-scale agricultural workers in southern Brazil. *Brazilian J Pharm Sci*. 2014;50(4):783–92.
31. Almeida MD. Relatório : Vigilância em Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos no Estado de Santa Catarina. :1–16.
32. BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística: IBGE. 2013. 2013. p. www.ibge.gov.br.

33. Delgado IF, Paumgarten FJR. Intoxicações e uso de pesticidas por agricultores do Município de Paty do Alferes, Rio de Janeiro, Brasil. *Cad Saude Publica* [Internet]. 2004;20(1):180–6. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2004000100034&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt
34. Hernández AF, Amparo Gómez M, Pérez V, García-Lario J V., Pena G, Gil F, et al. Influence of exposure to pesticides on serum components and enzyme activities of cytotoxicity among intensive agriculture farmers. *Environ Res*. 2006;102(1):70–6.
35. Strelitz J, Engel LS, Keifer MC, Clinic M. Blood acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase as biomarkers of cholinesterase depression among pesticide handlers. *Occup Environ Med*. 2014;71(12):842–7.
36. Jekanovi M. Biotransformation of organophosphorus compounds. *Toxicology*. 2001;166(3):139–60.
37. De Adad LMM, De Andrade HHR, Kvitko K, Lehmann M, de Cavalcante AACM, Dihl RR. Occupational exposure of workers to pesticides: Toxicogenetics and susceptibility gene polymorphisms. *Genet Mol Biol*. 2015;38(3):308–15.
38. Shenhar-Tsarfaty S, Berliner S, Bornstein NM, Soreq H. Cholinesterases as biomarkers for parasympathetic dysfunction and inflammation-related disease. *J Mol Neurosci*. 2014;53(3):298–305.
39. Oliveira-Silva JJ, Alves SR, Meyer A, Perez F, Sarcinelli P de N, da Mattos R de CO, et al. Influence of social-economic factors on the pesticide poisoning, Brazil. *Rev Saude Publica*. 2001;35(2):130–5.
40. Aparecida S, Câmara V, Silva IS, Rose E, Cury J. Exposição a agrotóxicos : determinação dos valores de referência para colinesterase plasmática e eritrocitária. 2012;49(3):163–9.
41. Salvatore AL, Bradman A, Castorina R, López J, Barr DB, Snyder J, et al. Occupational Behaviors and Farmworkers' Pesticide Exposure: Findings From a Study in Monterey County, California. *Am J Ind Med*. 2008;51(10):782–94.

42. Brasil. Norma Regulamentadora NR31. 2005.
43. BRASIL. Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas - SINITOX. 2013. 2013. p. sinitox.iciet.fiocruz.br.
44. Greget R, Dadak S, Barbier L, Lauga F, Linossier-Pierre S, Pernot F, et al. Modeling and simulation of organophosphate-induced neurotoxicity: Prediction and validation by experimental studies. *Neurotoxicology* [Internet]. 2016;54:140–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuro.2016.04.013>
45. Hernández AF, López O, Rodrigo L, Gil F, Pena G, Serrano JL, et al. Changes in erythrocyte enzymes in humans long-term exposed to pesticides: Influence of several markers of individual susceptibility. *Toxicol Lett*. 2005;159(1):13–21.
46. BRASIL. Nota Técnica 006 - Atualização dos parâmetros para monitoramento da Colinesterase nos agentes de saúde que utilizam inseticidas organofosforados e carbamatos nas atividades de controle vetorial. 2013. 2013. p. 13.
47. Valle AM, Radic Z, Rana BK, Mahboubi V, Wessel J, Shih PB, et al. Naturally occurring variations in the human cholinesterase genes: heritability and association with cardiovascular and metabolic traits. *J Pharmacol Exp Ther* [Internet]. 2011;338(1):125–33. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3126649&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
48. Dimov D, Kanev K, Dimova I. Correlation between butyrylcholinesterase variants and sensitivity to soman toxicity. *Acta Biochim Pol*. 2012;59(2):313–6.
49. FANG, Lei; HOU, Shurong; XUE, Liu; ZHENG, Fang; ZHANG C-G. Amino-Acid Mutations to Extend the Biological Half-life of a Therapeutically Valuable Mutant of Human Butyrylcholinesterase. *Chem Biol Interact*. 2014;214:18–25.
50. Dantas VGL, Furtado-Alle L, Souza RLR, Chautard-Freire-Maia EA. Obesity and variants of the GHRL (ghrelin) and BCHE (butyrylcholinesterase) genes. *Genet Mol Biol* [Internet]. 2011;34(2):205–7. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-47572011000200006&lng=en&nrm=iso&tlng=en

51. Brimijoin S, Chen VP, Pang YP, Geng L, Gao Y. Physiological roles for butyrylcholinesterase: A BChE-ghrelin axis. *Chem Biol Interact* [Internet]. 2016;259:271–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2016.02.013>
52. Rathish D, Agampodi SB, Jayasumana MACS, Siribaddana SH. From organophosphate poisoning to diabetes mellitus: The incretin effect. *Med Hypotheses* [Internet]. 2016;91:53–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mehy.2016.04.002>
53. MILANO GE, LEITE N, CHAVES TJ, EISFELD G, SOUZA RLR, FURTADO-ALLE L. Atividade da butirilcolinesterase e fatores de risco cardiovascular em adolescentes obesos submetidos a um programa de exercícios físicos. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2013;57(7):533–7.
54. Sunay SZ, Kayaaltı Z, Bayrak T, Söylemezoğlu T. Effect of paraoxonase 1 192 Q/R polymorphism on paraoxonase and acetylcholinesterase enzyme activities in a Turkish population exposed to organophosphate. *Toxicol Ind Health* [Internet]. 2015;31(12):1061–8. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0748233713487246>
55. Furlong CE, Marsillach J, Jarvik GP, Costa LG. Paraoxonases-1, -2 and -3: What are their functions? *Chem Biol Interact* [Internet]. 2016;259:51–62. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2016.05.036>
56. Kulka M. A review of paraoxonase 1 properties and diagnostic applications. *Pol J Vet Sci*. 2016;19(1):225–32.
57. Gómez-Martín A, Hernández AF, Martínez-González LJ, González-Alzaga B, Rodríguez-Barranco M, López-Flores I, et al. Polymorphisms of pesticide-metabolizing genes in children living in intensive farming communities. *Chemosphere*. 2015;139:534–40.
58. Caetano AR. Marcadores SNP: conceitos básicos, aplicações no manejo e no melhoramento animal e perspectivas para o futuro. *Rev Bras Zootec*. 2009;38(SUPPL. 1):64–71.
59. Ismail NA, Rafii MY, Mahmud TMM, Hanafi MM, Miah G. Molecular markers: a potential resource for ginger genetic diversity studies. *Mol Biol Rep*. 2016;43(12):1347–58.

60. Saúde D em C da. DECS. 2017. 2017. p. <http://decs.bvs.br/>.
61. Boberg DR, Furtado-Alle L, Souza RLR, Chautard-Freire-Maia EA. Molecular forms of butyrylcholinesterase and obesity. *Genet Mol Biol*. 2010;33(3):452–4.
62. Costa, Lucio G.; GIORDANO, Gennaro; COLE, Toby B.; MARSILLACH, Judit; FURLONG CE. PARAOXONASE 1 (PON1) AS A GENETIC DETERMINANT OF SUSCEPTIBILITY TO ORGANOPHOSPHATE TOXICITY. *Toxicology*. 2013;307:115–22.
63. Pena SDJ, di Pietro G, Fuchshuber-Moraes M, Genro JP, Hutz MH, Kehdy F de SG, et al. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. *PLoS One*. 2011;6(2).
64. Suarez-Kurtz G, Pena SDJ, Struchiner CJ, Hutz MH. Pharmacogenomic diversity among Brazilians: Influence of ancestry, self-reported color, and geographical origin. *Front Pharmacol*. 2012;3 NOV(November):1–7.
65. Hernández AF, Mackness B, Rodrigo L, López O, Pla A, Gil F, et al. Paraoxonase activity and genetic polymorphisms in greenhouse workers with long term pesticide exposure. *Hum Exp Toxicol* [Internet]. 2003;22(11):565–74. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1191/0960327103ht400oa>
66. Santos HC, Horimoto AVR, Tarazona-Santos E, Rodrigues-Soares F, Barreto ML, Horta BL, et al. A minimum set of ancestry informative markers for determining admixture proportions in a mixed American population: the Brazilian set. *Eur J Hum Genet* [Internet]. 2016;24(5):725–31. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ejhg.2015.187>
67. Lima-Costa MF, Rodrigues LC, Barreto ML, Gouveia M, Horta BL, Mambrini J, et al. Genomic ancestry and ethnoracial self-classification based on 5,871 community-dwelling Brazilians (The Epigen Initiative). *Sci Rep* [Internet]. 2015;5(1):9812. Available from: <http://www.nature.com/articles/srep09812>
68. NCUBE, Ngqabutho M; FOGO, Christopher; BESSLER, Patricia; JOLLY, Curtis M; JOLLY PE. Factors associated with self-reported symptoms of acute pesticide poisoning among farmers in northwestern Jamaica. *Arch Environ Occup Health*. 2011;66(2):65–74.

69. Jandotti ANAC. Universidade federal de sergipe pró-reitoria de pós-graduação e pesquisa programa de pós-graduação em ciências aplicadas à saúde. 2016;0–106.
70. Boltzmann M, Mohammadi B, Samii A, Münte TF, Rüsseler J. Structural changes in functionally illiterate adults after intensive training. *Neuroscience* [Internet]. 2017;344:229–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.12.049>
71. Meyer-Baron M, Knapp G, Schper M, van Thriel C. Meta-analysis on occupational exposure to pesticides - Neurobehavioral impact and dose-response relationships. *Environ Res* [Internet]. 2015;136:234–45. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2014.09.030>
72. Capra EP, Ferreira SBL, Da Silveira DS, Ferreira AO. Evaluation of web accessibility: An approach related to functional illiteracy. *Procedia Comput Sci*. 2012;14(Dsai):36–46.
73. Karami-Mohajeri S, Hadian M, Fouladdel S, Azizi E, Hosseini R, Abdollahi M. Mechanisms of muscular electrophysiological and mitochondrial dysfunction following exposure to malathion, an organophosphorus pesticide. *Hum Exp Toxicol*. 2014;33(3):251–63.
74. KAMAKURA W, MAZZON JA. Critérios De Estratificação E Comparação De Classificadores Socioeconômicos No Brasil. *Rev Adm Empres* [Internet]. 2016;56(1):55–70. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75902016000100055&lng=pt&tlng=pt
75. Cornelis R, Heinzow B, Herber RFM, Molin Christensen J, Poulsen OM, Sabbioni E, et al. Sample Collection Guidelines for Trace Elements in Blood and Urine. *J Trace Elem Med Biol*. 1996;10(2):103–27.
76. Karasova JZ, Maderycova Z, Tumova M, Jun D, Rehacek V, Kuca K, et al. Activity of cholinesterases in a young and healthy middle-European population: relevance for toxicology, pharmacology and clinical praxis. *Toxicol Lett*. 2017;

APÊNDICES

Apêndice A – Artigo

ANALYSIS OF THE ASSOCIATION BETWEEN GENETIC POLYMORPHISMS AND CHARACTERISTIC SYMPTOMOLOGY OF EXPOSURE TO PESTICIDES IN RURAL WORKERS

ALYSSON FELLIPE COSTA TELLES ⁽¹⁾

JULIANA LIMA DOS SANTOS ⁽³⁾

FELIPE RODRIGUES DE MATOS ⁽²⁾

FABIANO ALVIM PEREIRA ⁽²⁾

CLAUDIA CRISTINA KAISER ⁽²⁾

- (1) Post graduate Student in Applied Health Sciences Program - Federal University of Sergipe;
- (2) Post Graduate Professor in Applied Health Sciences Program - Federal University of Sergipe;
- (3) Under graduate Student – Tiradentes University.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Apêndice B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Título da pesquisa: Análise de indicadores de saúde e marcadores de risco à exposição a agrotóxicos nos trabalhadores das lavouras da laranja nas regiões de maior produção do Estado de Sergipe

Endereço:

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

. Rua Padre Alvares Pitangueira, nº 248 – Centro. Lagarto-SE.

CEP 49.400-000 - Fone: +55 (79) 2105-6537

Eu, _____, natural de _____, RG: _____, CPF: _____, estado civil _____, morador à rua _____, entendo que estou sendo convidado(a) para participar do projeto de pesquisa intitulado, **Análise de indicadores de saúde e marcadores de risco à exposição a agrotóxicos nos trabalhadores das lavouras da laranja nas regiões de maior produção do Estado de Sergipe.**

As informações existentes neste documento são para que eu entenda perfeitamente os objetivos da pesquisa e para saber que a minha participação é espontânea. Eu entendo que a recusa, por minha parte, em continuar a participar desta pesquisa em qualquer momento ocorrerá sem penalidades para a minha pessoa. Se durante a leitura deste documento houver alguma dúvida, eu entendo que deverei fazer perguntas aos pesquisadores para que eu possa entender perfeitamente do que se trata.

Eu entendo que este projeto está sendo desenvolvido por profissionais e pesquisadores empenhados na em um melhor entendimento das condições de trabalho dos citricultores e condições que envolvem a intoxicação por uso de agrotóxicos, e que os resultados serão publicados e divulgados preservando a identificação dos participantes. Autorizo aos responsáveis do estudo a utilizar os meus registros de histórico médico atual e pregresso, resultados de exames laboratoriais feitos nesta pesquisa, a qualquer tempo durante a pesquisa, sabendo que estes serão divulgados somente preservando minha identificação, da mesma forma os casos positivos de intoxicação serão encaminhados ao CIATOX (Centro de Informação e Investigação Toxicológica (Ciatox) do Hospital de Urgência de Sergipe Governador João Alves Filho (HUSE)), localizado à Avenida Tancredo Neves, s/n, bairro Capucho, CEP: 49080-470, Aracaju/SE, e respeitando-se a demanda do serviço, receberão atendimento prioritário.

Eu entendo que serei submetido a coletas de amostras de sangue, para exames bioquímicos para avaliação de intoxicação por organofosforados (colinesterases), marcadores de lesão hepática (fosfatase alcalina (FA), aspartato transferase (AST), alanina transferase (ALT), e gama glutamil transferase (γ -GT); marcadores bioquímicos de função pancreática (glicemia, amilase pancreática e lipase) e hemograma completo. Também será realizada extração de material genético (DNA) de minhas células e analisados marcadores genéticos para intoxicação por organofosforados (rs854560, rs662 e rs1803274). Eu entendo que a coleta da amostra se fará no dia em que eu assinar este termo e que não terei custos financeiros referentes a esta pesquisa. Entendo que os objetivos desta pesquisa são: avaliar indicadores de saúde (Bioquímicos) e marcadores de risco (Genéticos, Ambientais e Comportamentais) à exposição aos agrotóxicos no trabalhadores das lavouras da laranja nas regiões de maior produção do estado, que reúne os municípios de Lagarto, Boquim, Salgado, Tomar do Gerú, Umbaúba, Itabaianinha, Arauá e Cristinópolis – SE.

Li e compreendi todas as informações que foram passadas a mim sobre a minha participação neste projeto de pesquisa. Também a mim foi dada a oportunidade de discutir e fazer perguntas. Todas as minhas perguntas foram respondidas satisfatoriamente. Concordo voluntariamente com a minha participação neste estudo. Receberei uma cópia assinada deste formulário de consentimento informado. Minha concordância em participar deste estudo não retira nenhum dos meus direitos legais, no caso de negligência ou má prática de qualquer pessoa ou instituição que esteja envolvida neste estudo. Poderei também a qualquer momento durante a pesquisa pedir minha retirada do trabalho sem nenhuma penalidade. Após a autorização para a realização desta pesquisa junto ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), o pesquisador abaixo nominado vem, por meio deste termo, assumir o compromisso de que a identidade das pessoas envolvidas entrevistadas seja mantida em absoluto sigilo e anonimato. Além disso, vem garantir que todas as informações e amostras biológicas coletadas serão utilizadas estritamente para a realização do projeto de pesquisa e elaboração de publicações e artigos científicos, e demais materiais relativos a este projeto, mantendo-se confidenciais, e ainda as amostras biológicas serão armazenadas em freezer -80°C com chave, no laboratório do NUPAST da UFS, durante o período de realização da pesquisa, sendo descartado após o término da mesma.

Data: ____/____/____

Assinatura: _____

Testemunha: _____

Testemunha: _____

Pesquisadora - Profa. Dra. Claudia Cristina Kaiser – *Pesquisadora responsável*

Apêndice C – Questionário Sócio Econômico e Ocupacional..

QUESTIONÁRIO GERAL

IDENTIFICAÇÃO

1. **Número do voluntário (conforme o crachá):** _____
2. **Data de nascimento:** ____ / ____ / ____
3. **Gênero** () M () F
4. **Endereço (localização):** _____
5. **Grau de instrução:**
 () Até fundamental I incompleto () Até Fundamental II Incompleto () Até Médio Incompleto
 () Até Superior Incompleto () Até Superior Completo
6. **Estado Civil**
 () Casado/união estável () Solteiro () Viúvo/Separado/Divorciado
7. **Condição Do Entrevistado**
 () Proprietário/Produtor () Cônjuge () Filho/Filha () Genro/Nora () Cunhado/Cunhada
 () Irmão/Irmã () Trabalhador
8. **Local de residência**
 () Estabelecimento () Comunidade Rural () Município
 () Outro Município. Qual? _____
9. **Perfil socioeconômico – formulário ABEP-CCEB 2015**

Grau de instrução do chefe da família

	Quantidade				
	0	1	2	3	4 ou +
Banheiros	0	3	7	10	14
Empregados domésticos	0	3	7	10	13
Automóveis	0	3	5	8	11
Microcomputador	0	3	6	8	11
Lava louça	0	3	6	6	6
Geladeira	0	2	3	5	5
Freezer	0	2	4	6	6
Lava roupa	0	2	4	6	6
DVD	0	1	3	4	6
Micro-ondas	0	2	4	4	4
Motocicleta	0	1	3	3	3
Secadora roupa	0	2	2	2	2

Grau de instrução do chefe de família e acesso a serviços públicos

Escolaridade da pessoa de referência	
Analfabeto / Fundamental I incompleto	0
Fundamental I completo / Fundamental II incompleto	1
Fundamental II completo / Médio incompleto	2
Médio completo / Superior incompleto	4
Superior completo	7
Serviços públicos	
	Não Sim
Água encanada	0 4
Rua pavimentada	0 2

() Até 3ª série do fund. () 4ª série do fundamental (primário completo) () Fund. Completo (antigo ginásio) () Médio completo (antigo colegial) () Superior completo () Superior incompleto

DIAGNÓSTICO BIOLÓGICO

10. **Auto relato de etnia:**
 () Pardo () Negro () Branco () Índio () Amarelo
11. **Está em tratamento médico?** () SIM () NÃO
12. **Fraqueza muscular?** () SIM () NÃO
13. **Tremor noturno?** () SIM () NÃO
14. **Convulsões?** () SIM () NÃO

CONTATO COM O VENENO

15. **Já teve contato com veneno agrícola (aplicou, entrou na lavoura recém-pulverizada, fez o preparo, lavou roupas e instrumentos de aplicação)?**
() nunca () direto () indireto
16. **Já sofreu intoxicação com agrotóxico "veneno"? () NÃO () SIM, Quando foi? _____**
17. **Após aplicar o produto o(a) senhor(a) sentiu sintomas? Referir os sintomas agudos. (náuseas, vômitos, dor de cabeça) () SIM () NÃO**
18. **Quais os sintomas presentes? O que o senhor sentiu quando aconteceu?**
() Dor de cabeça () Tontura/vertigens () Tremores () Salivação () Náusea () Vômito
() Taquicardia () Tosse () Irritabilidade () Alergia () Falta de ar/dispneia () Formigamento
() Irritação ocular () Outro(s):
19. **Qual a frequência desses sintomas?**
() Nunca () Uma vez () Mais de uma vez () Sempre

ANEXOS

Anexo A - Comprovante de envio do artigo para a Revista

Environmental Health Perspectives

ANALYSIS OF THE ASSOCIATION BETWEEN GENETIC POLYMORPHISMS AND CHARACTERISTIC SYMPTOMOLOGY OF EXPOSURE TO PESTICIDES IN RURAL WORKERS

—Manuscript Draft—

Manuscript Number:	
Full Title:	ANALYSIS OF THE ASSOCIATION BETWEEN GENETIC POLYMORPHISMS AND CHARACTERISTIC SYMPTOMOLOGY OF EXPOSURE TO PESTICIDES IN RURAL WORKERS
Short Title:	Occupational risk analysis
Article Type:	Research Article
Section/Category:	Multidisciplinary
Keywords:	Organophosphates; Occupational Health; Genetic Polymorphisms; Butyrylcholinesterase; Paraoxonase
Corresponding Author:	Alysson Felipe Costa Telles, Pós Graduated Universidade Federal de Sergipe Lagarto, Sergipe BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Universidade Federal de Sergipe
First Author:	Alysson Felipe Costa Telles, Pós Graduated
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Alysson Felipe Costa Telles, Pós Graduated Claudia Cristina Kaiser, Dra Felipe Rodrigues de Melo, Dr. Fabiano Alvim Pereira, Dr Juliana Lima dos Santos, Under graduate Student
Order of Authors Secondary Information:	
Manuscript Region of Origin:	BRAZIL
Abstract:	Introduction: Cholinesterases and Paraoxonase 1 are mediators of poisoning process by organophosphate (OP). Monitor the activities of these enzymes and know the genetic variability of the agricultural population is of great importance in the evaluation of possible risk groups for poisoning OP. Objective: This case-control study aimed to investigate the association of genetic markers (tag SNPs) in BChE and PON1 genes with characteristic symptoms of exposure to OP pesticides in rural workers. Methodology: 427 patients, both sexes, mean age 40.96 years old, divided into 226 with and 201 without characteristic symptomatology of exposure to pesticides, were genotyped for three tag SNPs, rs1803274 (BChE gene), rs662 e rs854580 (PON1 gene). Also, socio-demographic and economic parameters were analyzed. BChE activity was demonstrated, as well as the profile of workers' health was evaluated. For the test of association of the categorical variables, the Chi-square test and Fisher's exact test. For the genetic models tests the Binary Logistic Regression was used in the Additive Model and Fisher's Exact Test and Chi-Square Test in the Dominant and Recessive Models. P values < 0.05 were considered significant. Results: Statistically significant association for place of residence with symptoms; between the rs1803274 and symptoms, in the Recessive model; between rs1803274 and muscle weakness, in the Additive and Dominant model. The BChE activity was associated with rs662, in the Recessive model. Conclusion: The results revealed that growers have some exposure factors that make this population vulnerable to OP poisoning.

Powered by Editorial Manager® and Production Manager® from Aries Systems Corporation

Additional Information:	
Question	Response
Have all authors confirmed the CFI information included on your CFI form and declaration?	Yes
Funding Information:	
Manuscript Classification:	20.030: Genotoxicity, gene expression; 20.050: Neurological, psychological, behavior; 20.090: Risk estimation, management, remediation, mitigation; 30.090: Environmental chemicals; 30.130: Genetics; 30.220: Occupational exposures; 30.230: Pesticides

Anexo B –ao Comitê de Ética e Pesquisa

UFS - HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO DE ARACAJÚ
DA UNIVERSIDADE FEDERAL

**COMPROVANTE DE ENVIO DO PROJETO****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Análise de indicadores de saúde e marcadores de risco à exposição a agrotóxicos nos trabalhadores das lavouras da laranja nas regiões de maior produção do estado de Sergipe.

Pesquisador: claudia cristina montes

Versão: 2

CAAE: 12988313.8.0000.5546

Instituição Proponente:

DADOS DO COMPROVANTE

Número do Comprovante: 013828/2013

Patrocinador Principal: MINISTERIO PUBLICO DA UNIAO

Informamos que o projeto Análise de indicadores de saúde e marcadores de risco à exposição a agrotóxicos nos trabalhadores das lavouras da laranja nas regiões de maior produção do estado de Sergipe. que tem como pesquisador responsável claudia cristina montes, foi recebido para análise ética no CEP UFS - Hospital Universitário de Aracaju da Universidade Federal de Sergipe / HU-UFS em 14/03/2013 às 09:29.

Endereço: Rua Cláudio Batista s/nº

Bairro: Sanatório

CEP: 49.060-110

UF: SE **Município:** ARACAJU

Telefone: (79)2105-1805

E-mail: cephu@ufs.br

Anexo C – Critério de Classificação Econômica no Brasil – ABEP (Associação Brasileira de Empresas de Pesquisa)



Critério de Classificação Econômica Brasil

O Critério de Classificação Econômica Brasil, enfatiza sua função de estimar o poder de compra das pessoas e famílias urbanas, abandonando a pretensão de classificar a população em termos de "classes sociais". A divisão de mercado definida abaixo é, exclusivamente de classes econômicas.

SISTEMA DE PONTOS

Posse de Itens

	Quantidade de Itens				
	0	1	2	3	4 ou +
Televisão em cores	0	2	3	4	5
Rádio	0	1	2	3	4
Banheiro	0	2	3	4	4
Automóvel	0	2	4	5	5
Empregada mensalista	0	2	4	4	4
Aspirador de pó	0	1	1	1	1
Máquina de lavar	0	1	1	1	1
Videocassete e/ou DVD	0	2	2	2	2
Geladeira	0	2	2	2	2
Freezer (aparelho independente ou parte da geladeira duplex)	0	1	1	1	1

Grau de Instrução do chefe de família

Analfabeto / Primário incompleto	0
Primário completo / Ginásial incompleto	1
Ginásial completo / Colegial incompleto	2
Colegial completo / Superior incompleto	3
Superior completo	5

CORTES DO CRITÉRIO BRASIL

Classe	PONTOS	TOTAL BRASIL (%)
A1	30-34	1
A2	25-29	5
B1	21-24	9
B2	17-20	14
C	11-16	36
D	6-10	31
E	0-5	4