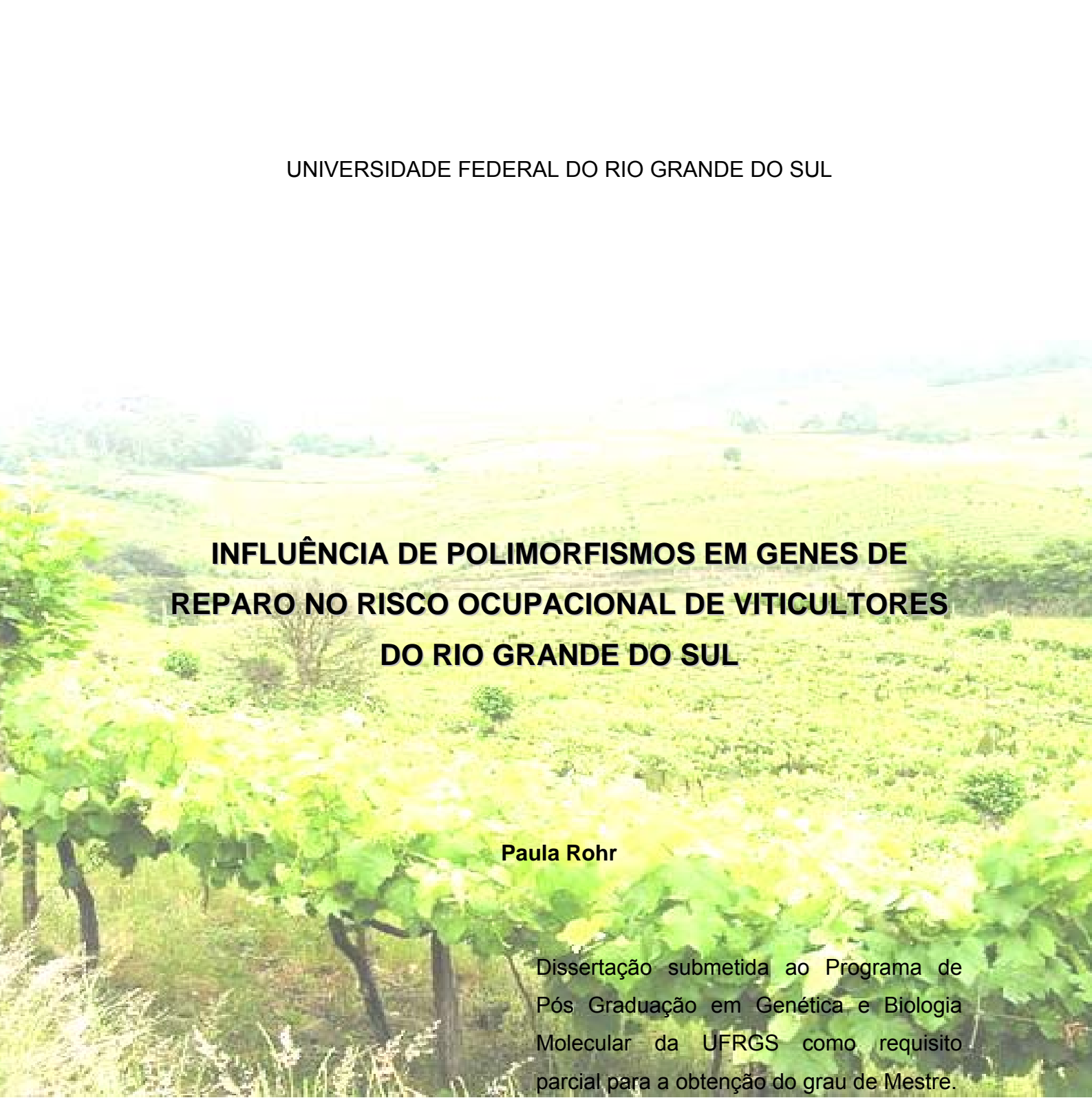


UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL



**INFLUÊNCIA DE POLIMORFISMOS EM GENES DE  
REPARO NO RISCO OCUPACIONAL DE VITICULTORES  
DO RIO GRANDE DO SUL**

**Paula Rohr**

Dissertação submetida ao Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

**Orientação: Prof. Dr. João Antônio Pêgas Henriques**

**Co-orientação: Prof. Dra. Kátia Kvitko**

Porto Alegre, abril de 2008

Este trabalho foi desenvolvido no **Laboratório de Imunogenética**, nas dependências do **Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, e foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Henrique, meu orientador, pela confiança no desenvolvimento deste projeto e, principalmente, pelo incentivo na fase final para que eu conseguisse desenvolver mais.

À Prof.<sup>a</sup> Kátia Kvitko, minha co-orientadora, que vivenciou o dia-a-dia deste trabalho, por todo o apoio e incentivo, principalmente quando nada parecia dar certo e pela amizade durante estes anos de parceria.

Às Prof.<sup>a</sup> Jeniffer Saffi e Temenouga Guecheva (Nucha) pela colaboração na escolha de genes e polimorfismos a serem estudados.

À Prof.<sup>a</sup> Juliana da Silva por todo o suporte e idéias para as análises, o que algumas vezes me enlouqueceram, mas com certeza enriqueceram o trabalho.

À Vanina que me apresentou o mundo da “exposição ocupacional”, e que mesmo a distância desfez as minhas dúvidas de como usar o SPSS.

Ao PPGBM, por todo o suporte durante estes dois anos, principalmente do Elmo e da Ellen que estão sempre muito dispostos a ajudar todos os alunos.

A todo o Imunopovo, que acompanharam todos os passos deste trabalho, tanto nas partes boas, como das não tão boas assim, e que muitas vezes participaram, guardando os PCRs ou clivagens. Especialmente: ao Dani G, responsável pela minha entrada no laboratório, e que junto com o Gustavo, parceiros de uns passeios um pouco arriscados; à Gabi, à Fe Malinsky e ao Bruno, por compartilharem as “maravilhas” da biologia molecular, PCRs que não funcionavam, inexplicavelmente, ou funcionavam muito bem, até o negativo; à

Lari, pelas incontáveis tentativas de coloração com prata que não deu certo; à Fê Rabaioli, que apesar de pouco tempo de convívio, acompanhou bem de perto a parte mais complicada, o final.

À Pri, à Déia Vargas e à Raquel, não só por todo apoio no lab, como pela amizade e toda diversão fora dele.

À Déia Carolina, pela amizade de longa data, e que apesar da nossa “separação” no final, acompanhou e apoio boa parte desse projeto.

À Cris e ao Ernesto, por todo apoio e incentivo e apoio para tudo, sempre.

Aos amigos de POA: Lucas, Luis, Fabiano, Felipe, Fê Pedone, Camila Zanella, que acompanharam este projeto, mesmo sem estarem presentes no dia-a-dia, sempre tinham uma idéia de como as coisas andavam.

Aos amigas de Montenegro: Adri e Ismael, Cláudia e Marcelo, Grazi e Adriano, Milla e Ricardo e Lauren pela amizade e por me lembrarem que a minha vida não é apenas o “mundo biológico”. Em especial, à Lauren que participou de todos os altos e baixos dos últimos 3 meses, e sempre me incentivou.

À toda a minha família, que mesmo sem entender o que eu faço, sempre esteve ao meu lado me apoiando. Em especial: aos tios Clóvis e Sigrid que foram meu ponto de apoio na capital; às tias Anna e Bere, por toda a força nos momentos em que precisei; a Bruna, a maninha que briga comigo, mas sempre que preciso ta lá para me ajudar.

E aos meus pais, que amo tanto e acompanharam o passo-a-passo desse projeto, como de toda a minha vida, vibraram a cada vitória, as vezes mais que eu mesma, e quando as coisas não iam muito bem, estavam lá para dar uma força e incentivo a continuar.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	9
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE TABELAS.....	12
RESUMO.....	13
ABSTRACT.....	15
1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1. Exposição ocupacional.....	17
1.2. Viticultura.....	18
1.2.1. Pesticidas.....	19
1.3. Monitoramento Biológico.....	25
1.3.1. Biomarcadores de Exposição.....	26
1.3.2. Biomarcadores de Efeito.....	28
1.3.3. Biomarcadores de Suscetibilidade.....	29
1.3.3.1. Sistemas de Metabolização/Detoxificação.....	30
1.3.3.2. Sistemas de Reparo.....	32
1.3.3.2.1. Reversão <i>in situ</i> .....	33
1.3.3.2.2. Reparo por Excisão de Base (BER).....	33
1.3.3.2.3. Reparo por Excisão de Nucleotídeos (NER).....	35
1.3.3.2.4. Reparo de Emparelhamento Incorreto (Mismatch Repair ou MMR).....	38
1.3.3.2.5. Reparo em Quebra na Fita Dupla.....	39
1.3.4. Variação Populacional de Genes de Reparo.....	43

<b>2. OBJETIVO .....</b>	<b>45</b>
<b>3. MATERIAIS &amp; MÉTODOS .....</b>	<b>46</b>
<b>3.1. Caracterização da Amostra .....</b>	<b>46</b>
<b>3.2. Detecção dos Genótipos por PCR/RFL .....</b>	<b>48</b>
<b>3.2.1 OGG1*Ser326Cys.....</b>	<b>50</b>
<b>3.2.2. XRCC1*Arg194Trp .....</b>	<b>50</b>
<b>3.2.3. XPD*Ile199Met e XPD*Asp312Asn.....</b>	<b>51</b>
<b>3.2.4. Rad51*G135C .....</b>	<b>52</b>
<b>3.2.5. XRCC4*Ile401Thr .....</b>	<b>53</b>
<b>3.3. Teste de Micronúcleo.....</b>	<b>53</b>
<b>3.4. Ensaio Cometa .....</b>	<b>54</b>
<b>3.5. Análise Estatística .....</b>	<b>55</b>
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>56</b>
<b>4.1. Polimorfismos da via BER.....</b>	<b>60</b>
<b>4.2. Polimorfismos da via NER.....</b>	<b>61</b>
<b>4.3. Polimorfismos da via HR .....</b>	<b>62</b>
<b>4.4. Polimorfismos da via NHEJ.....</b>	<b>63</b>
<b>4.5. Associação dos Danos com Genótipos Favoráveis ou Desfavoráveis</b>	<b>63</b>
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>66</b>
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>74</b>
<b>7. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>76</b>
<b>8. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>77</b>

<b>9. ANEXOS .....</b>	<b>85</b>
<b>9.1. TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO .....</b>	<b>85</b>
<b>9.2. QUESTIONÁRIO PESSOAL .....</b>	<b>87</b>
<b>9.3. TABELA EXTRAÍDA DO ARTIGO SILVA <i>et al.</i> (2008) .....</b>	<b>90</b>



## **LISTA DE ABREVIATURAS**

AC – Aberrações Cromossômicas

BER – Reparo por Excisão de Bases

FD – Frequência de Dano (Ensaio Cometa)

GGR – Reparo Geral do Genoma

HR – Recombinação Homóloga

ID – Índice de Dano (Ensaio Cometa)

MMR – Reparo por Emparelhamento Incorreto de Bases

MN – Micronúcleo

NER – Reparo por Excisão de Nucleotídeos

NHEJ – Recombinação Não Homóloga

TCI – Troca de Cromátides Irmãs

TCR – Reparo Acoplado à Transcrição

VIT – Amostra de Viticultores

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
<b>Figura 1</b>	Imagem dos parreirais da região nordeste do estado do Rio Grande do Sul, Brasil.	18
<b>Figura 2</b>	Teste Cometa, células classificadas de 0, sem dano a 4, com a maior parte do DNA na “cauda do cometa”.	27
<b>Figura 3</b>	Teste de MN: Linfócitos Binucleados com 1 e 2 Micronúcleos.	29
<b>Figura 4</b>	Vias possíveis de biotransformação dos xenobióticos.	31
<b>Figura 5</b>	Reparo por Excisão de base em humanos. A via curta inicia com a atividade glicosilase seguida pela excisão e remoção da base com dano pela APE1 e posterior incorporação de bases corretas pela DNA Polimerase I e ligação para a reparação da fita. A via longa é semelhante, mas após a excisão da fita há a remoção de um número maior de nucleotídeos.	34
<b>Figura 6</b>	Esquema da via NER. Após o reconhecimento do dano, que é diferente em GGR e em TCR, o complexo de reparo é recrutado. Primeiramente, ocorre a ação das helicases, seguido da abertura das fitas pelo complexo TFIIH, remoção da região com o dano e síntese correta e ligação das fitas.	36
<b>Figura 7</b>	O esquema da via MMR. Após o reconhecimento do emparelhamento incorreto, ocorre a degradação da região com o dano, síntese para o preenchimento da região e ligação da fita	39
<b>Figura 8</b>	Esquema da via HR. Com o reconhecimento de quebra de fita dupla há um pareamento entre a fita danificada e sua homóloga que serve de molde para a síntese de DNA.	41
<b>Figura 9</b>	Esquema da via NHEJ em células de mamíferos. Após o reconhecimento das extremidades, estas são processadas e, em seguida, religadas.	42

- Figura 10** Gráfico demonstrando a utilização de equipamentos de proteção 48  
pelos agricultores.
- Figura 11** Gráfico com a frequência de MN nos indivíduos expostos com os 64  
diferentes genótipos *PON1* e de reparo, considerando *XPB*,  
*Rad51* e *XRCC4*
- Figura 12** Gráfico com a frequência de MN nos indivíduos expostos com os 65  
diferentes genótipos *PON1* e de reparo, considerando *Rad51* e  
*XRCC4*.
-

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
<b>Tabela 1</b>	Dados químicos e toxicológicos dos inseticidas utilizados pelos produtores rurais da região Nordeste do Estado.	21
<b>Tabela 2</b>	Dados químicos e toxicológicos dos fungicidas utilizados pelos produtores rurais da região Nordeste do Estado.	22
<b>Tabela 3</b>	Dados químicos e toxicológicos dos herbicidas utilizados pelos produtores rurais da região Nordeste do Estado.	23
<b>Tabela 4</b>	Freqüências de polimorfismos de genes de reparo em diferentes populações.	43
<b>Tabela 5</b>	Características demográficas dos indivíduos estudados	47
<b>Tabela 6</b>	Vias, genes, polimorfismos que serão estudados, com <i>primers</i> e enzimas de restrição utilizados.	49
<b>Tabela 7</b>	Distribuição das freqüências genotípicas e freqüências dos alelos variantes (em negrito) de cada um dos polimorfismos estudados.	57
<b>Tabela 8</b>	Efeito dos genótipos individuais nos biomarcadores de exposição e efeito dos não-expostos e expostos (média ± D.P.)	58
<b>Tabela 9</b>	Efeito dos genótipos de reparo combinados com o genótipo de <i>PON1</i> nos biomarcadores de efeito e de exposição	59

## RESUMO

A produção de uvas é uma importante atividade econômica da região nordeste do estado do Rio Grande do Sul. Nesta atividade são utilizadas misturas complexas de pesticidas para a proteção da plantação, mas que representa um potencial risco à saúde humana dos indivíduos expostos. Os sistemas de metabolização e reparo de DNA são importantes moduladores dos efeitos da exposição a substâncias genotóxicas. O presente estudo teve como objetivo principal avaliar a influência dos seguintes polimorfismos em genes de reparo: *OGG1\*Ser326Cys*, *XRCC1\*Arg194Trp*, *XPB\*Ile199Met*, *XPB\*Asp312Asn*, *Rad51\*G135C* e *XRCC4\*Ile401Thr*, nos níveis de danos ao DNA em trabalhadores expostos a pesticidas. A genotipagem destes polimorfismos foi realizada utilizando a técnica de PCR/RFLP. Os danos no DNA foram avaliados pelas técnicas de Ensaio Cometa (Índice de Danos – ID e Frequência de Danos – FD) e Teste de Micronúcleo (MN) em 107 trabalhadores expostos a pesticidas e em 65 indivíduos não expostos a pesticidas. Diferenças nos níveis de ID, FD e MN entre os indivíduos com os diferentes genótipos de reparo individualmente ou quando combinados com o genótipo *PON1*, cuja proteína codificada está envolvida na metabolização de pesticidas, foram testadas pelo teste U de Mann-Whitney, já que a distribuição desde dados desviou significativamente da normalidade. O polimorfismo *XPB\*Ile199Met* apresentou uma frequência baixa do alelo variante (0,03), o que não possibilitou a análise da influência deste polimorfismo. Os genótipos de *XRCC1\*Arg194Trp* e de *Rad51\*G135C*, tanto individualmente quanto na análise combinada com o genótipo de *PON1\*Gln192Arg*, não apresentaram diferenças significativas estatísticas nos

níveis dos biomarcadores, apesar de ambos apresentarem uma tendência de proteção à exposição a pesticidas (*XRCC1\*Trp/ -* e *Rad51\*G/G*). O genótipo de *OGG1\*Ser326Cys* demonstrou influência nos níveis de ID e de FD nos indivíduos expostos, individualmente ( $P=0,032$  e  $P=0,009$ ), como também quando combinado com o genótipo de *PON1\*Gln192Arg*, sendo que o genótipo selvagem apresentou menores níveis de dano. O genótipo selvagem do polimorfismo *XRCC4\*Ile401Thr* apresentou, nos indivíduos expostos um efeito protetor na frequência de MN ( $P=0,024$ ). O polimorfismo *XPB\*Asp312Asn* apresentou influência em ID e FD na análise do genótipo individualmente, quando o genótipo selvagem correspondeu aos menores níveis nos biomarcadores ( $P=0,028$  e  $P=0,035$ ). Assim, os resultados demonstram que os danos detectados pelo Ensaio Cometa, principalmente danos oxidativos, quebras de fita simples e dupla, *crosslinks* DNA-DNA e DNA-proteína, são reparados preferencialmente pela via BER, que é descrita como responsável pela reparação de pequenas lesões como bases oxidadas ou reduzidas. Enquanto que no reparo dos danos detectados no Teste de MN, clastogênese e aneugênese, são as vias HR e NHEJ que atuam no reparo de quebras de fita dupla, como também a via NER.

## ABSTRACT

Grape production is an important economic activity in northeast region of Rio Grande do Sul State. In this activity, pesticides complex mixtures are constantly utilized to protect the grapevines, but represent a human health potential risk to exposes individuals. The metabolizing and repair systems are important exposure effects modulators. The present study had as objective to evaluate the repair gene polymorphisms (*OGG1\*Ser326Cys*, *XRCC1\*Arg194Trp*, *XPB\*Ile199Met*, *XPB\*Asp312Asn*, *Rad51\*G135C*, *XRCC4\*Ile401Thr*) influences in DNA damage levels of exposed pesticides workers. The genotyping of these polymorphisms was performed by PCR/RFLP method. The DNA damage was evaluated by Comet assay (Damage Index – DI and Damage Frequency – DF) and Micronuclei test (MN) in 107 exposed workers and 65 non-exposed to pesticides. Differences in DI, DF, MN and between the different repair genotypes individually or combined to *PON1* genotype, of which protein are involved in pesticides metabolizing, having a significant deviation from normality, were tested by the non-parametric Mann-Whitney U test. The *XPB\*Ile199Met* polymorphism present a lower frequencies of the variant allele (0,03), and it was not possible analyze the influence of this polymorphism in damage levels. The *XRCC1\*Arg194Trp* and *Rad51\*G135C* polymorphisms, individually and combined to *PON1\*Gln192Arg* genotype, not demonstrated a statistical differences in biomarkers levels, even though both polymorphisms present a protection tendency to pesticides exposure (*XRCC1\*Trp/ – e Rad51\*G/G*). The *OGG1\*Ser326Cys* genotype showed influence in DI and DF levels into exposed group, individually  $P=0,032$  and  $P=0,009$ ), and when combined to *PON1\*Gln192Arg*, once that the

wild type genotype presents lower DNA damage levels. In exposed individuals, the wild type genotype *XRCC4\*Ile401Thr* presents a protector effect to MN frequencies (P=0,024). The *XPD\*Asp312Asn* polymorphism present influence in DI and DF in individually analyses, when the wild type genotype correspond to lower biomarkers levels (P=0,028 and P=0,035). Our results demonstrated that damage detected in Comet Assay, mainly the oxidative damage, single e double strand breaks, crosslink DNA-DNA e DNA-protein, are repaired principally by Base Excision Repair pathway, that are described as responsible for repair of small lesions as oxidized and reduced bases. While in the repair of damage detected in MN test, clastogênese and aneugênese, are the Recombination Homologous and Non Homologous End Joining that act in double strand break, as the Nucleotide Excision Repair also has a influence.



## 1. INTRODUÇÃO

Estamos constantemente expostos a diferentes produtos químicos que estão presentes em alimentos, remédios, herbicidas, pesticidas, produtos industriais, e até mesmo no ar, como partículas, compostos químicos orgânicos e inorgânicos. Muitas destas substâncias podem ter efeitos tóxicos no organismo, principalmente no DNA, como alterações celulares que, quando não reparadas, podem resultar em mutações gênicas, aberrações cromossômicas, apoptose, descontrole da regulação no crescimento celular e, até mesmo, no desenvolvimento de doenças (Keshava & Ong, 1999; Lucas *et al.*, 2001; Goode *et al.*, 2002; Kauffer & Vincent, 2006).

### 1.1. Exposição Ocupacional

Estudos mostram que trabalhadores de diversos ramos de produção apresentam chance de enfermidades recorrentes, devido à exposição a substâncias genotóxicas específicas de cada ramo, por isso, conhecida por exposição ocupacional (De Celis *et al.*, 2005; Fritschi *et al.*, 2005; Richiardi *et al.*, 2006). A exposição ocupacional, de uma maneira geral, foi avaliada como responsável por pelo menos 4% dos casos de câncer em humanos (National Occupational Research Agenda Team, 2003). Estudos de risco ocupacional reprodutivo também têm demonstrado aumento nas taxas de aborto espontâneo em mulheres que trabalham com químicos em hospitais e laboratórios. Estima-se que mais de 50% das mortes fetais, 30% dos casos de retardo mental, 20% dos casos de defeitos congênitos e 2% de problemas relacionados com infertilidade

masculina estejam associados a aberrações cromossômicas em células germinativas (Keshava & Ong, 1999).

## 1.2. Viticultura

A Região nordeste do estado do Rio Grande do Sul é uma importante produtora de uvas do Brasil, tendo sua economia baseada na atividade de viticultura (figura 1). No cultivo das videiras, para a proteção contra ervas daninhas, insetos e fungos são utilizados pesticidas, normalmente em misturas complexas. Na aplicação, os viticultores ficam bastante expostos a estas misturas de pesticidas.



**Figura 1.** Imagem dos parreirais da região nordeste do estado do Rio Grande do Sul, Brasil.

### 1.2.1. Pesticidas

Os pesticidas são os produtos químicos mais amplamente utilizados em todo o mundo (Hoyos *et al.*, 1996). O uso de pesticidas na agricultura e na indústria tem dobrado a cada 10 anos desde 1945, causando danos às plantações bem como para as populações expostas (Crinnion, 2000; Maroni *et al.*, 2000). Os inseticidas são os principais responsáveis por intoxicação na agricultura, em ambientes domésticos e públicos (Langenbach *et al.*, 1989). Os pesticidas podem ser classificados quanto ao uso em: inseticidas, fungicidas, herbicidas, raticidas (Ferrer, 2003).

Os pesticidas constituem produtos de afinidades químicas amplamente variadas, desde simples substâncias inorgânicas a moléculas orgânicas complexas (Langenbach *et al.*, 1989). Quimicamente, podem ser classificados em: organoclorados, organofosforados, carbamatos, ditiocarbamatos, bupiridílios, dentre outros.

As tabelas 1, 2 e 3 trazem dados químicos e toxicológicos dos inseticidas, fungicidas e herbicidas, respectivamente, mais utilizados na região nordeste do Rio Grande do Sul, segundo o Sindicato dos Agricultores de Caxias do Sul.

Os organoclorados foram os primeiros inseticidas orgânicos utilizados massivamente no mundo, por terem sido demonstrados eficazes e econômicos. São os pesticidas que por mais tempo persistem no meio ambiente, devido a sua estabilidade na luz solar, na umidade, no ar e no calor. A absorção dos organoclorados ocorre pelas vias cutânea, respiratória e digestiva. Seus mecanismos de ação não são completamente conhecidos. São lipossolúveis,

assim depositam-se com seus produtos de degradação na gordura animal, inclusive humana. Os organoclorados são teratogênicos e atravessam a barreira placentária (Alves, 1986; Ferrer, 2003).

Os organofosforados são os pesticidas que apresentam maior toxicidade para o homem. Os principais compostos produzidos no mundo deste grupo são Paration e Malation, que atuam impedindo a ação da acetilcolinesterase. Assim, a enzima é inativada permanentemente nas várias sinapses colinérgicas do sistema nervoso central e periférico (Araújo & Queiroz, 2000). A contaminação por organofosforados ocorre rápida e eficazmente, através da respiração, trato gastrointestinal e pela pele, sendo acumulada nos tecidos ricos em lipídios. Este acúmulo depende da duração da exposição e do efeito nos tecidos, podendo ser na seguinte ordem: tecido adiposo, cérebro, rim, músculo, pulmão, coração, fígado e sangue (Sauviat & Pages, 2002).

Já os carbamatos, que são usados como pesticidas, apresentam baixa toxicidade, têm absorção principalmente cutânea, mas a quantidade absorvida é bastante variável, conforme o composto. Facilmente atingem a corrente sanguínea, distribuindo-se pelos diferentes tecidos, porém não se depositam. Estes compostos apresentam uma variada possibilidade de vias de degradação. Os carbamatos também são capazes de inibir a enzima acetilcolinesterase e pseudocolinesterase (Ferrer, 2003).

**Tabela 1.** Dados químicos e toxicológicos dos inseticidas utilizados pelos produtores rurais da região Nordeste do Estado.

Nome Fantasia	Nome Comum	Princípio Ativo	Quantidade de Princípio Ativo (g/l)	Classificação	Grupo Químico	Classe Toxicológica (*)
Decis	Deltamethrine	(S)-(-ciano-m-fenoxibenzil (1R,3R) 3(2,2-dibromovinil) dimetil ciclopropano carboxilato	25	Inseticida piretróide	Carboxilato	III
Folidol	Paration metílico	Tiofosfato de dimetil paranitrofenila	600	Inseticida de contato	Organofosforado	I
Kival	Vamidotion	n-metil-(0,0-dimetil-tiofosforil-5-tio-3-metil-2-valeramida	300	Inseticida e acaricida sistêmico	Organofosforado	II
Karate	Labdacyalotrin	(-ciano-3-fenoxibenzil-3-2(2-cloro-3,3,3-trifluoroprop-1-enil)2,2-dimetil ciclopropano carboxilato	50	Inseticida piretróide	Carboxilato	III
Lebaycid	Fention	0,0-dimetil-0-(3-metil-mercapto-4-metilfenil tiofosfato	500	Inseticida de contato	Organofosforado	II
Supracid	Medidation	0,0-dimetil-s-92-metóxi-1,3,4-tiadiazol-5-(4-OH)-onil-4-metil-ditiofosfato	400	Inseticida	Organofosforado	II
Vertimec	Avermctin Ala-Abamectin	5-0-demectilavermectin Ala+(5-0-demetil) 25-(1-metiletil)	18	Inseticida e acarida	Origem biológica	III

\* Segundo a Portaria 3/MS: I-Extremamente tóxico, II-Altamente tóxico, III-Medianamente tóxico, IV-Pouco tóxico.

**Tabela 2.** Dados químicos e toxicológicos dos fungicidas utilizados pelos produtores rurais da região Nordeste do Estado.

Nome Fantasia	Nome Comum	Princípio Ativo	Quantidade de Princípio Ativo (g/l)	Classificação	Grupo Químico	Classe Toxic. *
Benlate	Benomyl	Metil-1-(butilcarbomoil)-2-benzimidazol-carbamato	500	Fungicida sistêmico	Benzimidazol	III
Cercobin	Thiophanate Methyl	1,1-bis-(3-metoxicarbonil-2-tioureido) benzeno	700	Fungicida sistêmico	Benzimidazol	IV
	Cymoxanil	2-2 ciano-N [(etilamino)-carbonil]-2-(metoxiimino) acetamida	80		Acetamida	
Curzate M + Zinco	Maneb	Etileno bis-ditiocarbamato de manganês	640	Fungicida sistêmico	Ditiocarbamato	III
	Sulfato de Zinco	Sulfato de Zinco	20		Acetamida	
Daconil	Chlorothalonil	Tetracloroisofaltonitrila	750	Fungicida de contato	Ftalonitrila	II
Delan	Dithianon	2,23-dicarbonitrila-1,4-ditio-antraquinona	750	Fungicida sistêmico	Antraquinona	II
Derosal	Carbendanzin	2-(metóxi-carbomoil)-benzimidazol	500	Fungicida sistêmico	Benzimidazol	III
Dithane	Mancozeb	Etileno bis-ditocarbamato de manganês e zinco	800	Fungicida e Acaricida	Ditiocarbamato	II
Folpan	Folpet	n-(triclorometiltio)-ftalimida	500	Fungicida	Ftalimidas	III
Manzate	Mancozeb	Etileno bis-ditocarbamato de manganês e zinco	800	Fungicida sistêmico	Ditiocarbamato	III
Ridomil Mancozeb BR	Metalaxyl + Mancozeb	MetiLD,L,n (2,6dimetilfenil) —(2'-metoxiacetil)alaninato	80	Fungida sistêmico	Alaninato	II
		Etileno bis-ditiocarbamato de manganês e zinco	640		Ditiocarbamato	
Aliete	Fosetyl-AL	Alumínio tris(etilfosfanato)	800	Fungicida sistêmico	Cúprico	IV
Captan	Captan	N-[(triclorometil) tio]-4-ciclohexeno-1,2-dicarboximida	473	Fungicida não sistêmico	Ftalimidas	III
Rovral	Iprodione	3- (3,5-diclorofenil)-N-isipropil-2,4-dioxoimidazolidine-carboxamide	500	Fungicida	Imidazol	IV

\* Segundo a Portaria 3/MS: I-Extremamente tóxico, II-Altamente tóxico, III-Medianamente tóxico, IV-Pouco tóxico.

**Tabela 3.** Dados químicos e toxicológicos dos herbicidas utilizados pelos produtores rurais da região Nordeste do Estado.

Nome Fantasia	Nome Comum	Princípio Ativo	Quantidade de Princípio Ativo (g/l)	Classificação	Grupo Químico	Classe Toxicológica (*)
Afalon	Linuron	3-(3,4-diclofenil)-1-metóxi-metil-uréia	450	Herbicida de ação seletiva	Uréia	III
Fusilade	Fluazifop-p-butil	Butil ®-2-(4-5-trifluorometil-2-piridiloxi-fenoxil-propionato)	12,5	Herbicida e graminicida sistêmico	Aril Oxi Fenoxi, Propionato	II
Gramoxone	Paraquat	1,11-dimetil-4,4'-bipiridílio dicloreto	200	Herbicida de contato	Bipiridílio	II
Gramocil	Paraquat	1,11-dimetil-4,4'-dicloreto de bipiridílio	200	Herbicida de contato	Bipiridílio	II
	Diuron	3(3,4- diclorofenil)-1,1-dimetil	100		Uréia	
Glifosato	Glifosato	Isopropilamina de N-(fosfometil) glicina	480	Herbicida sistêmico	Glicina	IV
		Isopropilamina de N-(fosfometil) glicina	480			
Roundup	Glifosate	Equivalente ácido de N-(fosfometil) glicina	361	Herbicida sistêmico	Glicina	IV
	Picloran	Sal de trietolamina do ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico	103		Picolínico	
Tordon	2,4-D sal de trietolamina	2,4-D sal de trietolamina	406	Herbicida sistêmico	Fenoxiacético	I

\* Segundo a Portaria 3/MS: I-Extremamente tóxico, II-Altamente tóxico, III-Medianamente tóxico, IV-Pouco tóxico

Os ditiocarbamatos têm utilização industrial, doméstica e na agricultura, alguns são utilizados para o controle de vetores na saúde pública. Estes compostos apresentam como característica química a presença de metais em suas moléculas. Os ditiocarbamatos apresentam como principais metabólitos dissulfideo de carbono que determina a ação em caso de intoxicação aguda (Maroni *et al.*; 2000, Ferrer, 2003).

Entre os bupiridílios, o mais conhecido é o Paraquat, que foi sintetizado pela primeira vez em 1882, e atua como pesticida bloqueando a respiração e fotossíntese de muitos vegetais. É facilmente degradado no solo, sendo fotossensível. A sua absorção oral é bastante rápida, enquanto que a absorção cutânea é bastante lenta. O Paraquat é um herbicida que possui um nitrogênio quaternário extremamente tóxico para seres humanos e animais, resultando em danos em múltiplos órgãos, incluindo fígado, rim e pulmão (Saibara *et al.*, 2003). Em casos de intoxicações agudas pode ocorrer a morte principalmente por parada respiratória (Suntres, 2002).

Estudos de exposição ocupacional a pesticidas, que avaliam aberrações cromossômicas, troca de cromátides irmãs, Teste de Micronúcleo (MN) e Teste Cometa, encontram um aumento significativo destes biomarcadores de exposição e efeito, sugerindo evidência de efeitos genotóxicos induzidos por estes compostos (Falck *et al.*, 1999; Garaj-Vrhovac & Zeljezic, 2001; Shaham *et al.*, 2001; Zeljezic & Garaj-Vrhovac, 2001; Pastor *et al.*, 2003; Grover *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2008).

A exposição a pesticidas já foi relacionada com problemas de saúde agudos, como náuseas, tonturas, vômitos, dores de cabeça e abdominais e



problemas de pele e visão. Também já foi demonstrada a associação da exposição a pesticidas com problemas de saúde crônicos como problemas respiratórios, de memória, câncer, depressão, deficiências neurológicas, abortos, defeitos congênitos, entre outros (Ecobichon, 1996; Daniels *et al.*, 1997; O'Malley, 1997; Eskenazi *et al.*, 1999; Engel *et al.*, 2000; Das *et al.*, 2001; Stallones & Beseler, 2002; Arcury *et al.*, 2003; Garcia *et al.*, 2003; Van Maele-Fabry, 2003; Strong *et al.*, 2004; Firestone *et al.*, 2005; Fritschi *et al.*, 2005).

Há uma grande dificuldade em identificar substâncias individuais as quais os trabalhadores estão expostos, e o tipo de dano induzido por cada uma delas, pois, normalmente, são utilizadas misturas complexas destes compostos. Estas misturas podem ocasionar a potencialização dos efeitos individuais.

Como as taxas de desenvolvimento das enfermidades causadas pela exposição são difíceis de serem mensuradas, nota-se a importância de utilização de marcadores que detectem os danos da exposição mais precocemente, ou seja, a realização de um monitoramento biológico, que permita um melhor controle da exposição e, conseqüentemente, a minimização de danos (NORA, 2003).

### **1.3. Monitoramento Biológico**

Entre as diversas definições para monitoramento biológico, as mais completas são as que prevêm uma aplicação epidemiológica, utilizada para

mensurar diretamente a espécie e a distribuição de elementos tóxicos na população, como também para confrontar os indicadores biológicos com as modificações no estado de saúde dos indivíduos expostos (Pivetta *et al.*, 2001; Amorim, 2003; Siemiatycki *et al.*, 2004).

Para estudos de monitoramento populacional são usados marcadores biológicos, os biomarcadores. Este termo é usado para expressar uma medida específica de uma interação entre determinado sistema biológico com um agente genotóxico. Os biomarcadores são classificados em três categorias: (i) biomarcadores de exposição, (ii) biomarcadores de efeito, (iii) biomarcadores de suscetibilidade (Cebulska-Wasilewska, 2003).

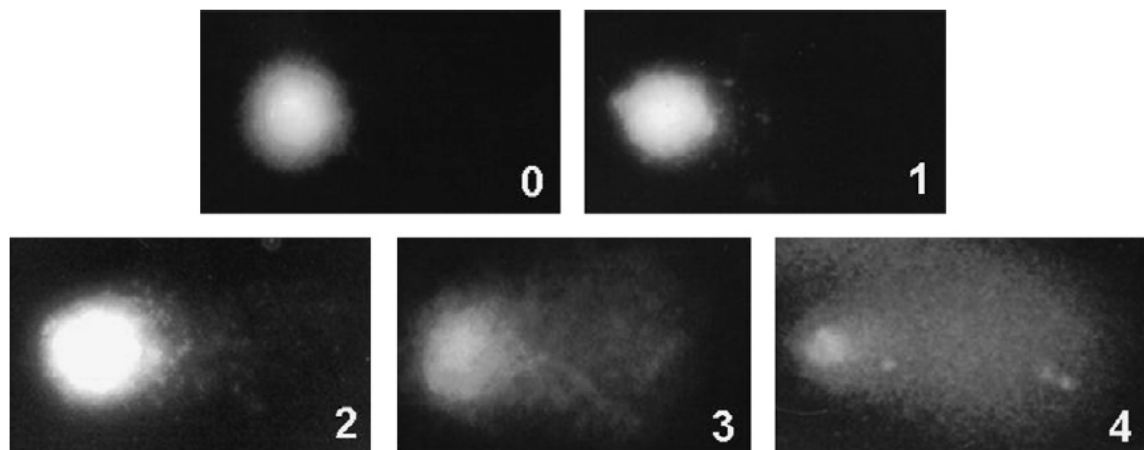
### **1.3.1. Biomarcadores de Exposição**

Os biomarcadores de exposição consistem em medidas quantitativas de substâncias químicas ou de seus metabólitos em fluidos biológicos ou, a medida de uma alteração bioquímica precoce e reversível em fluidos biológicos que reflita a exposição. Alguns biomarcadores de dose interna, como benzeno no sangue, ácido hipúrico e 2,5-hexanodiona na urina, refletem apenas a exposição recente ao benzeno, tolueno e n-hexano, respectivamente, enquanto outros refletem a exposição média dos últimos meses, como o chumbo e mercúrio no sangue, ou até mesmo em anos, como cádmio na urina (Lowry, 1995; World Health Organization, 2001; Bonassi & Au, 2002; Amorim, 2003).

O Ensaio Cometa (Figura 2) tem sido utilizado como um marcador de exposição importante, quando avaliado logo após o período de contato com o

xenobiótico, refletindo a ação do agente em quebras simples e dupla do DNA, dano oxidativo, *crosslinks* DNA-DNA, DNA-proteína, DNA-drogas e indução de apoptose. O teste pode também avaliar a capacidade individual de reparo, quando analisado em momentos diferentes após a exposição (até 24 horas e após esse período) e comparando os resultados destes períodos (Villela *et al.*, 2003; Maluf & Erdtmann, 2003).

O Teste Cometa apresenta como vantagem a simplicidade, rapidez e sensibilidade em detectar pequenas alterações e baixo custo (Villela *et al.*, 2003; Maluf & Erdtmann, 2003). Entretanto esta análise não é considerada como um teste de mutagenicidade uma vez que o efeito do reparo pode mudar o resultado final considerando a fixação de mutação.



**Figura 2.** Teste Cometa, células classificadas de 0, sem dano a 4, com a maior parte do DNA na “cauda do cometa”. Imagem modificada de Heuser *et al.* (2007).

### 1.3.2. Biomarcadores de Efeito

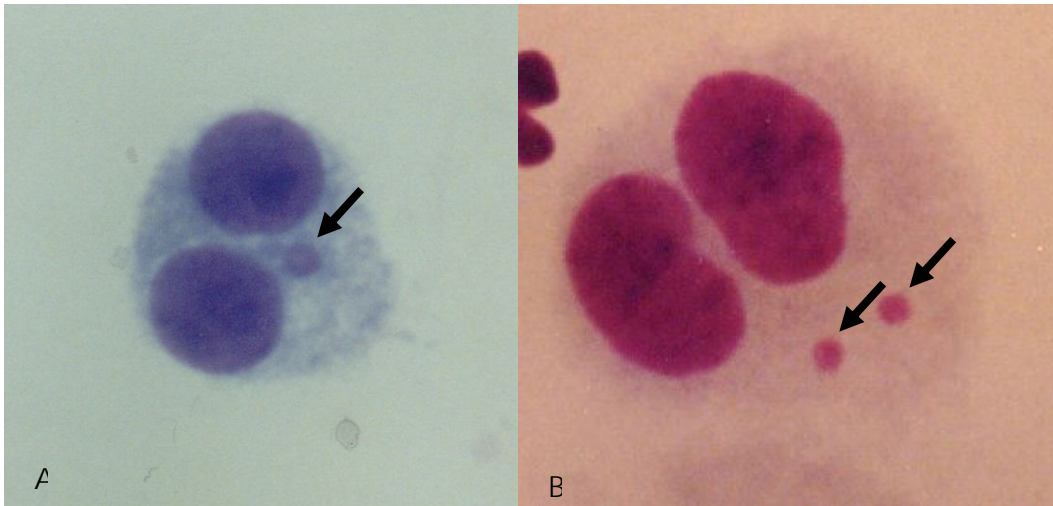
Os biomarcadores de efeito são parâmetros bioquímicos, fisiológicos, comportamentais e outras medidas de alterações no organismo, que refletem a interação da substância química com os receptores biológicos. Estes biomarcadores representam risco para o desenvolvimento de algumas doenças (Lowry, 1995; Cebulska-Wasilewska, 2003). Os mais utilizados são as medidas de dano de DNA, tais como: alteração de bases, formação aductos, aberrações cromossômicas (AC), troca de cromátides irmãs (TCI) e micronúcleos (MN).

O teste de aberrações cromossômicas é uma avaliação cromossômica internacionalmente aceita para biomonitoramento. Com ele são detectadas quaisquer mudanças na estrutura do cariótipo, por isso, é considerado um teste de mutagenicidade. O teste de AC tem utilização generalizada, podem ser realizado em diferentes organismos e tecidos, tanto *in vitro* como *in vivo*. Quando realizado *in vivo*, pode ser considerado também um teste de carcinogenicidade (Villela *et al.*, 2003).

A análise da frequência das trocas de cromátide irmãs, isto é, de translocações recíprocas entre o mesmo loco, é bastante sensível em estudos genotóxicos. Porém, além de ser muito trabalhoso, o teste de TCI não pode ser considerado um teste de mutagênese, é apenas um indicativo, pois a TCI não resulta necessariamente em mutações (Villela *et al.*, 2003).

O teste do MN (Figura 3) é um dos mais utilizados como padrão de aberrações cromossômicas em eucariotos, sendo o mais eficaz para o monitoramento humano. A formação do micronúcleo é resultado da perda de cromossomos inteiros, ou apenas fragmentos de cromossomos. Assim, este

teste detecta: mutagênese cromossômica, como clastogênese, aneugênese e danos no fuso mitótico (Villela *et al.*, 2003; Maluf & Erdtmann, 2003). Em uma análise conjunta, na mesma amostra, de Teste Cometa e Teste MN, pode-se inferir a atividade de mecanismos de reparo.



**Figura 3.** Teste de Micronúcleo: Linfócitos Binucleados com 1 e 2 Micronúcleos. Imagens cedidas por Vanina Heuser.

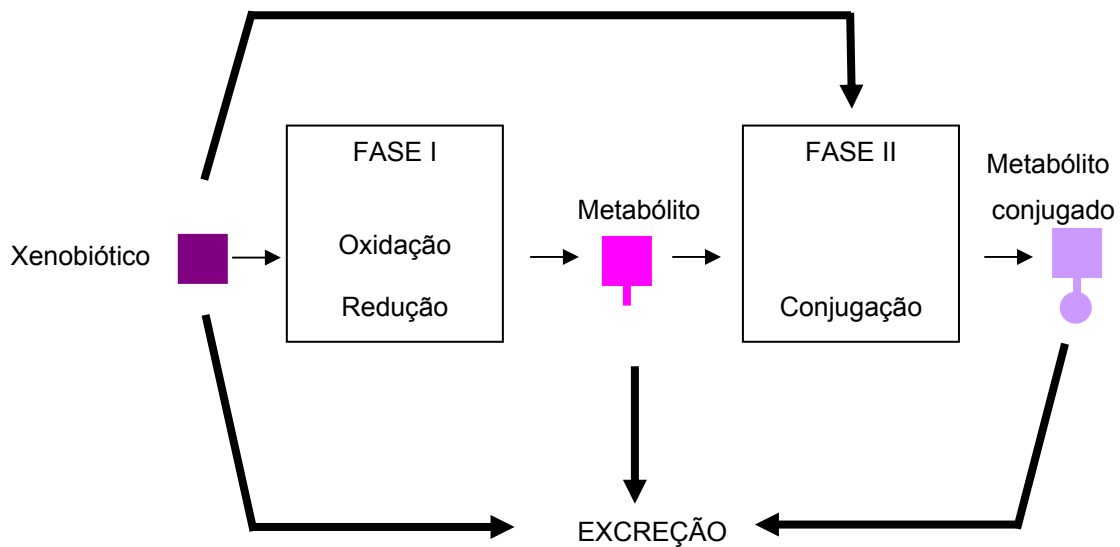
### 1.3.3. Biomarcadores de Suscetibilidade

Estudos de associação entre vários polimorfismos marcadores intermediários envolvidos na cascata de eventos genotóxicos/carcinogênicos podem fornecer informações úteis quanto ao papel da suscetibilidade genética individual e a relação com a exposição ambiental/ocupacional a xenobióticos. A suscetibilidade individual aos efeitos dos xenobióticos é modulada por diferenças na capacidade de metabolização/detoxificação e também pela eficiência no sistema de reparo (Omenn, 1991). Os diferentes tipos de lesão são relacionados à diversidade de xenobióticos a qual os indivíduos são expostos.

### **1.3.3.1. Sistemas de Metabolização/Detoxificação**

A capacidade de biotransformação está extremamente relacionada com polimorfismos nos genes das enzimas de metabolização/detoxificação, e conseqüente alteração da atividade das enzimas que participam deste processo (Wilkinson & Clapper, 1997).

A maior parte dos processos de biotransformação ocorre em duas fases, dependendo do substrato em que ele estiver atuando. As enzimas de fase I, ou enzimas de ativação, representadas pela superfamília do citocromo P450, ativam o xenobiótico, tornando-o mais eletrofílico e desta forma mais reativo, normalmente com a introdução de um grupamento funcional. Já as enzimas de fase II, ou de detoxificação, como a superfamília glutatona S-transferase, normalmente atuam com a conjugação dos metabólitos com um substrato endógeno, por enzimas transferases. O resultado deste processo é a transformação dos metabólitos em substâncias hidrofílicas, e assim, passíveis de excreção (Wilkinson & Clapper, 1997; Guecheva & Henriques, 2003). A figura 4 traz os processos de biotransformação possíveis.



**Figura 4.** Vias possíveis de biotransformação dos xenobióticos. Modificado de Guecheva & Henriques (2003).

Diferenças na capacidade de biotransformação, devido aos polimorfismos nos genes das proteínas envolvidas, já foram demonstradas como responsáveis pelas diferenças individuais nos resultados do Ensaio Cometa e Teste de MN. Entre as enzimas de fase I, ou de Ativação, os polimorfismos mais estudados, quanto à influência na resposta a exposição a xenobióticos, estão os polimorfismos que ocorrem nos genes *CYP1A1* e *CYP2E1*. Enquanto que nas enzimas de fase II, os polimorfismos mais estudados são os que ocorrem nos genes *GSTM1*, *GSTP1* e *GSTT1*.

Outro exemplo de enzima de metabolização de xenobióticos, principalmente de organofosforados, é a paraoxonase, proteína codificada pelo gene *PON1*. Este gene apresenta dois sítios polimórficos nos aminoácidos das posições 55 e 192. Para o polimorfismo na posição 192 o alelo *PON1\*Gln* apresenta menor atividade que o alelo *PON1 192Arg*. Isso sugere que os

indivíduos com o genótipo *PON1 Gln/Gln* ou *Gln/Arg* possam apresentar maior suscetibilidade à intoxicação a organofosforados que os indivíduos *PON1 Arg/Arg* (Humbert *et al.*, 1993).

### 1.3.3.2. Sistemas de Reparo

Estudos relacionados com polimorfismos em genes de reparo sugerem que estes também apresentam importância na modulação de efeitos genotóxicos. Alguns trabalhos demonstram a influência destes polimorfismos na atividade enzimática e a relação com a incidência de câncer, resposta a medicamentos quimioterápicos e radiosensibilidade (Norppa, 2001; Goode *et al.*, 2002; Efferth & Volm, 2005; De Ruyck *et al.*, 2005).

O sistema de reparo é dividido em vias, conforme o tipo de lesão em que ocorre, e em cada uma delas um grupo diferentes de enzimas é responsável pelo processo de reparo. Em humanos, foram descritas as seguintes vias: reversão do dano *in situ*, reparo por excisão de base (BER), reparo por excisão de nucleotídeo (NER), reparo de emparelhamento incorreto de bases (*mismatch repair* ou MMR), reparo em quebra na dupla fita (Recombinação Homóloga e Recombinação Não-Homóloga).



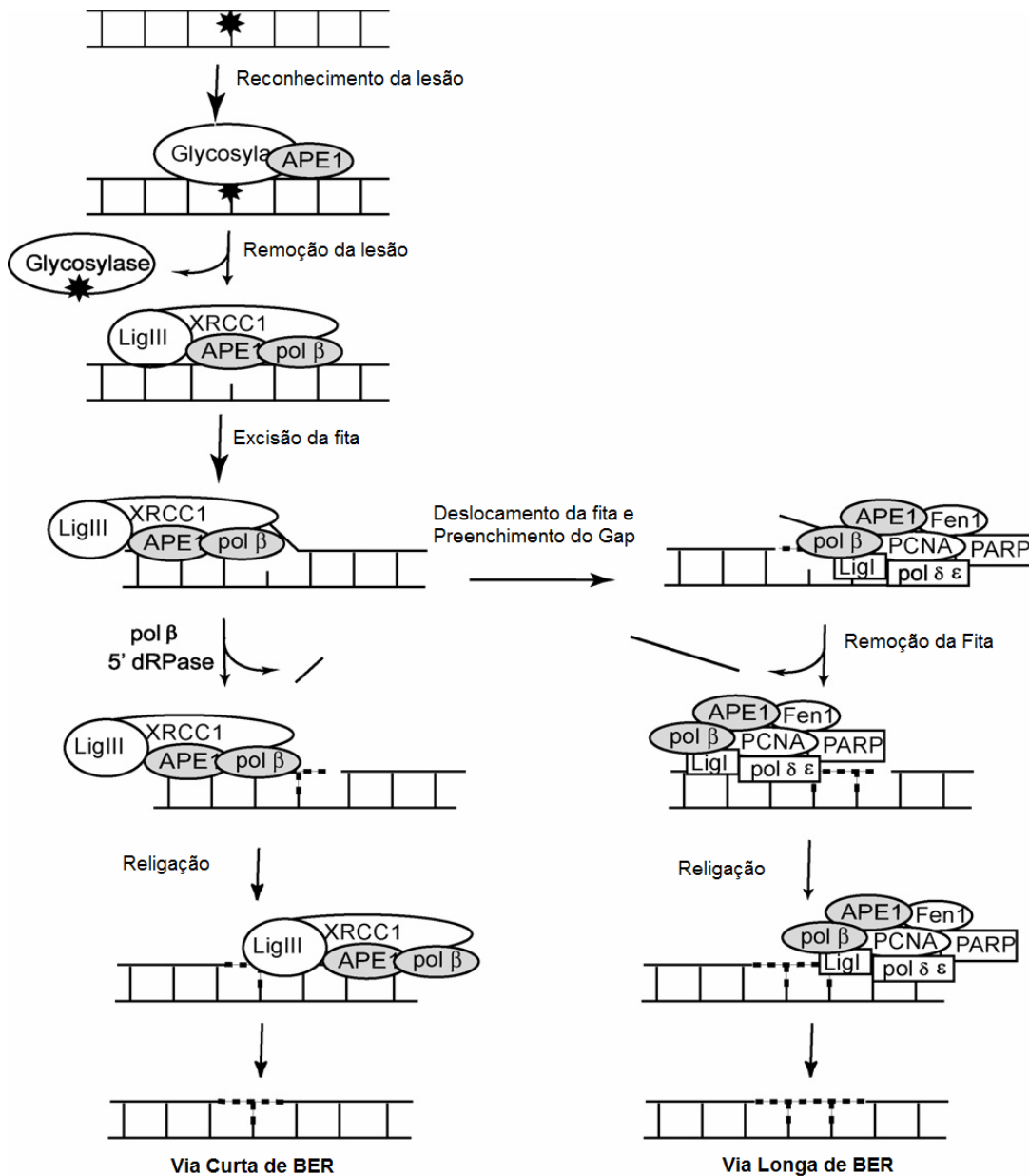
#### **1.3.3.2.1. Reversão *in situ***

A via de reversão de dano *in situ* é o sistema de reparo que acontece de forma mais fácil, eficaz e correta. É mais usado para a reparação das lesões induzidas por radiações. As enzimas com atividades alquiltransferase, que retiram grupamentos metil da posição O6, e DNA ligase I, responsável pelo reparo de quebras simples no DNA, são exemplos de enzimas que fazem parte desta via de reparação (Saffi & Henriques, 2003; Efferth & Volm, 2005).

#### **1.3.3.2.2. Reparo por Excisão de Bases (BER)**

A via BER atua em pequenas lesões como bases oxidadas ou reduzidas, aductos fragmentados ou produzidos por agentes alquilantes. Nesta via, que está representada na figura 5, a base com dano é removida por uma DNA glicosilase específica para cada uma das bases nitrogenadas, formando um sítio apurínico-apirimidínico ou abásico, sítio AP. Uma enzima AP endonuclease (por exemplo, a AP liase, hAP e AP hidrolase) cliva a ligação fosfodiéster da cadeia de DNA, a DNA Polimerase I remove a unidade residual de desoxirribose e insere a base correta. Após, a DNA ligase restaura a fita, pela via curta de BER. Enquanto que na via longa de BER são removidos de 2 a 13 nucleotídeos (Goode *et al.*, 2002; Saffi & Henriques, 2003). Porém, a maioria das DNA glicosilases envolvidas na via BER possuem também a atividade AP liases e, por isso, são conhecidas como DNA glicosilases bifuncionais, como as proteínas Ogg1 e Ntg1. Após a ação de uma DNA glicosilase bifuncional, os sítios AP seguem sendo processados pelas demais enzimas envolvidas na via. Além das enzimas envolvidas em cada passo,

existe também a proteína Xrcc1 que não atua diretamente na lesão do DNA, mas tem papel importante na coordenação da interação das várias enzimas envolvidas nesta via, como a Ogg1 (Marsin *et al.*, 2003).



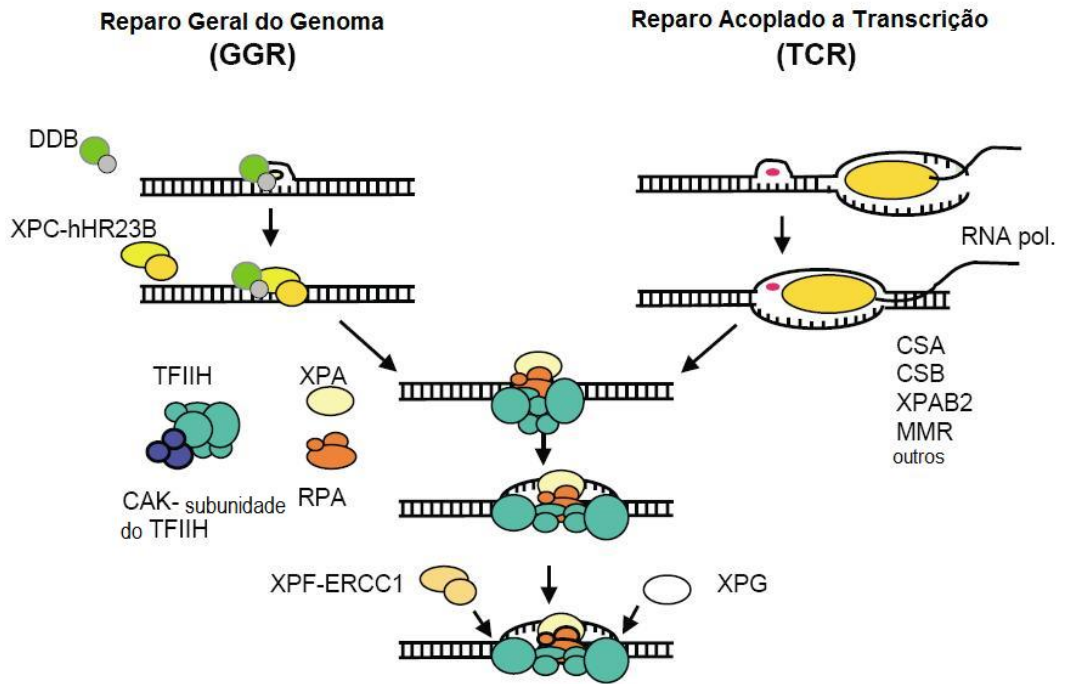
**Figura 5.** Reparo por Excisão de base em humanos. A via curta inicia com a atividade glicosilase seguida pela excisão e remoção da base com dano pela APE1 e posterior incorporação de bases corretas pela DNA Polimerase I e ligação para a reparação da fita. A via longa é semelhante, mas após a excisão da fita há a remoção de um número maior de nucleotídeos. Modificado de Almeida & Sobol (2007).

Alguns genes do sistema BER apresentam-se polimórficos e estudos associam estas variações com a suscetibilidade para a incorporação de danos no DNA e desenvolvimento de doenças como câncer (Lunn *et al.*, 1999; Hao *et al.*, 2004). Como exemplo, o polimorfismo no códon 326 do gene *OGG1*, resulta em uma troca do aminoácido serina por uma cisteína. Esta variante (*OGG1 326Cys*) gera uma proteína com maior atividade enzimática atuando no reparo causado por lesões derivadas de estresse oxidativo. Estudos deste polimorfismo sugerem o como um fator de risco de uma variedade de tumores humanos (Kohno *et al.*, 1998; Ito *et al.*, 2002; Takezaki, *et al.*, 2002; Hansen *et al.*, 2005).

Outro exemplo é o gene *XRCC1* que apresenta polimorfismos nos códon 194 (*Arg/Trp*) e 399 (*Arg/Gln*), gerando uma proteína com maior e menor eficiência de reparo, respectivamente, quando comparados com os alelos selvagens (Wang *et al.*, 2003). Au *et al.* (2003) demonstraram a associação do polimorfismo *XRCC1 399Arg* com troca de cromátides pela exposição a raios-X, como também com a porcentagem de células aberrantes pela exposição à luz UV.

#### **1.3.3.2.3. Reparo por Excisão de Nucleotídeos (NER)**

A via NER, que está representada na figura 6, repara lesões maiores, que levam a distorções estruturais importantes na cadeia de DNA, como: dímeros de pirimidinas, grandes aductos químicos e cross-link. A via NER é subdividida em duas vias: Reparo Acoplado à Transcrição (TCR) e Reparo Geral do Genoma (GGR) (van Hoffen *et al.*, 2003).



**Figura 6.** Esquema da via NER. As diferentes maneiras de reconhecimentos de danos para GGR e para TCR são seguidos por um processamento de lesão que para as duas vias requerem as mesmas enzimas. Modificado de van Hoffen *et al.* (2003)

A via de TCR é responsável pelo reparo de danos do DNA que está sendo transcrito e necessitam da atividade das enzimas RNA polimerase I e II. A lesão no DNA leva a uma distorção na dupla hélice, que apesar de pequena faz com que a transcrição pare, possibilitando o reparo da lesão pelo TCR, de uma maneira mais rápida do que pelo GGR (van Hoffen *et al.*, 2003).

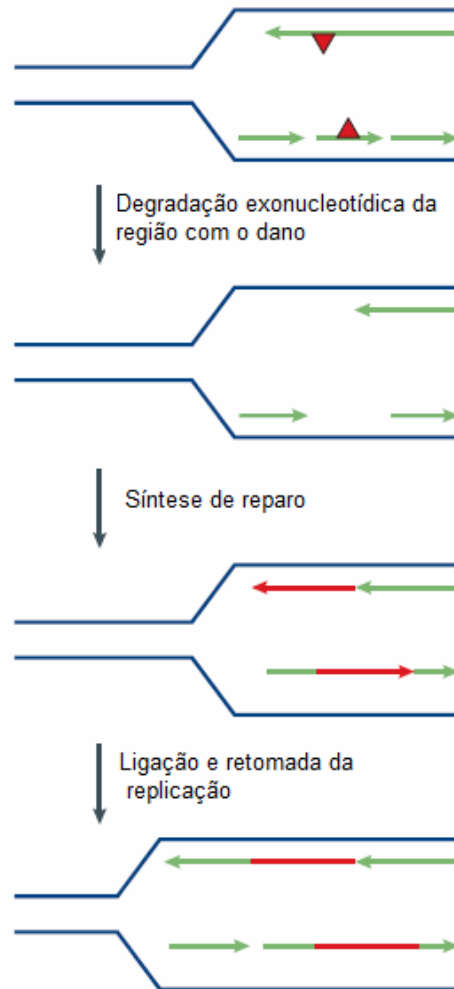
A via de GGR que envolve a atividade de reparo nas lesões de DNA pelo genoma inicia-se pelo reconhecimento do dano através do complexo enzimático Xpc/hHR23B, que fará o recrutamento das demais proteínas envolvidas na reparação global do genoma. Primeiramente são recrutadas as proteínas Xpb e Xpd (helicases) e os componentes do fator de transcrição da

RNA polimerase II (TFIIH), estes fazem a abertura de cerca de 30 pares de base em torno da lesão. A proteína Xpa é a responsável pelo correto posicionamento e estabilização do complexo enzimático e reconhece estruturas anormais no DNA e juntamente com a proteína Rpa, liga-se a regiões de cadeia simples de DNA. Este complexo possibilita a remoção desta região através de moléculas como Ercc1-Xpf e Xpg. Após a incisão ocorre a síntese correta desta região removida pela DNA polimerase (Goode *et al.*, 2002; Saffi & Henriques, 2003; Costa & Menck, 2004).

Estudos demonstram que polimorfismos nos genes da via NER estão relacionados com diferenças na capacidade de reparo individual. Como exemplo os polimorfismos no gene *XPD*, que ocorrem nos códons 199 (Ile/Met), 312(Asp/Asn) e 715 (Lys/Gln) (Lunn *et al.*, 2000). Diferentes trabalhos demonstraram relação entre aumento da frequência de aberrações cromossômicas induzidas por xenobióticos e o polimorfismo no códon 312 do gene *XPD* (Lunn *et al.*, 2000; Au *et al.*, 2003; Gao *et al.*, 2003).

#### **1.3.3.2.4. Reparo de Emparelhamento Incorreto de Bases (Mismatch Repair ou MMR)**

O sistema MMR, demonstrado na Figura 7, corrige erros de replicação, elevando muito a fidelidade do processo. Neste caso o reparo se dá pelo reconhecimento do pareamento incorreto que é feito pelo heterodímero das proteínas Msh2 e Msh6 (Mut S $\alpha$ ), e com o recrutamento das proteínas homologas de Mut L. Em mamíferos, já foram descritos quatro homólogos para o gene *Mut L*: *MLH1*, *PMS1*, *PMS2* e *MLH3* (Goode *et al.*, 2002; Saffi & Henriques, 2003; Costa & Menck, 2004). Polimorfismos nos genes da via MMR são responsáveis pela a maioria dos casos de câncer de cólon (HNPCC – câncer coloretal hereditário não poliposo), como também por casos de mama (Kowalski *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2005).



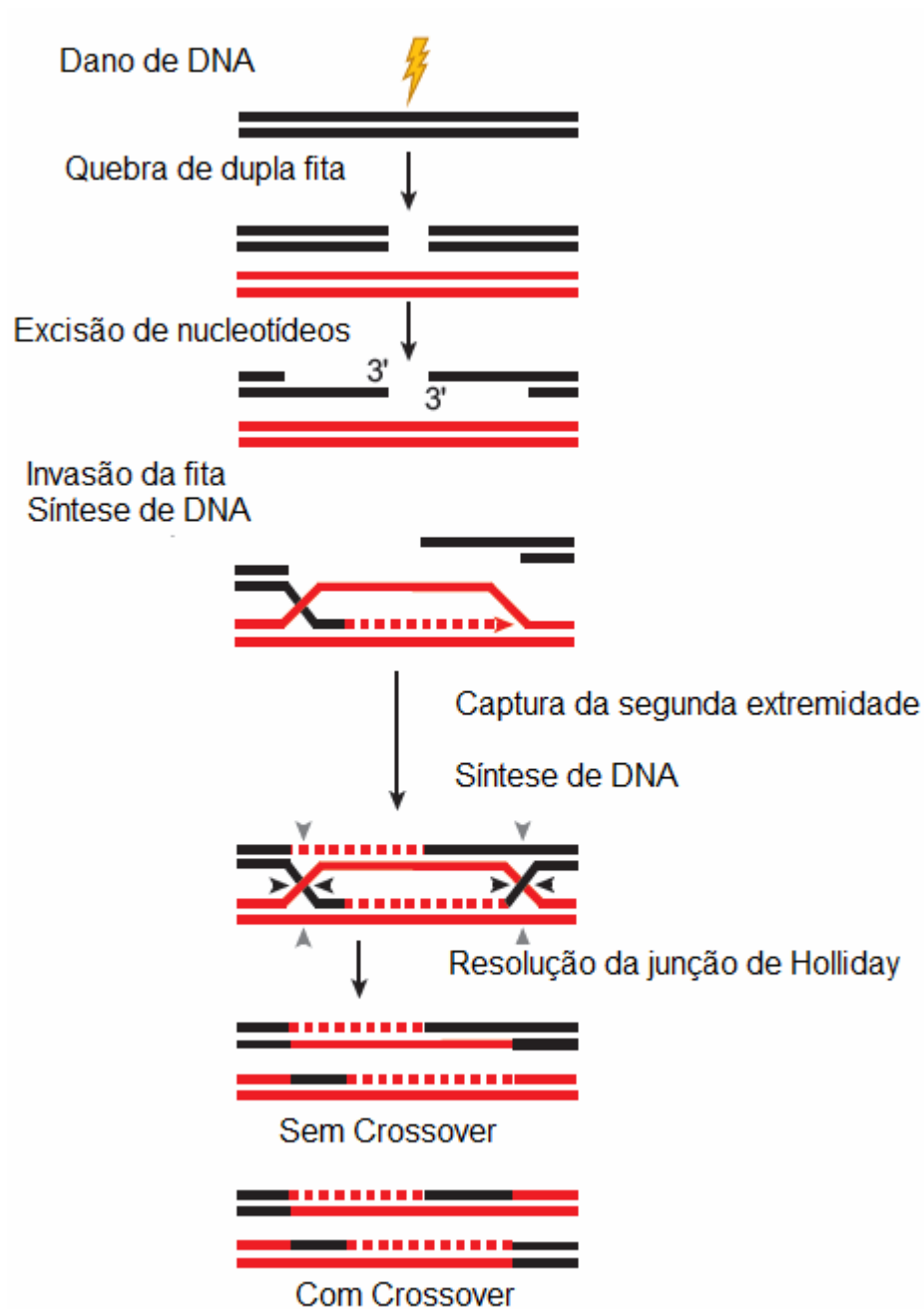
**Figura 7.** O esquema da via MMR. Após o reconhecimento do emparelhamento incorreto, ocorre a degradação da região com o dano, síntese para o preenchimento da região e ligação da fita. Modificado de Jiricny (2006).

### 1.3.3.2.5. Reparo de Quebra na Dupla Fita

A quebra da dupla fita de DNA pode ser ocasionada tanto por erro durante a replicação, como pela ação de agentes exógenos como radiações ionizantes. Este é o tipo de reparo mais complexo, pois não apresenta uma fita molde sem dano. Existem duas vias para este mecanismo de reparo: i) recombinação homóloga e ii) recombinação não homóloga.

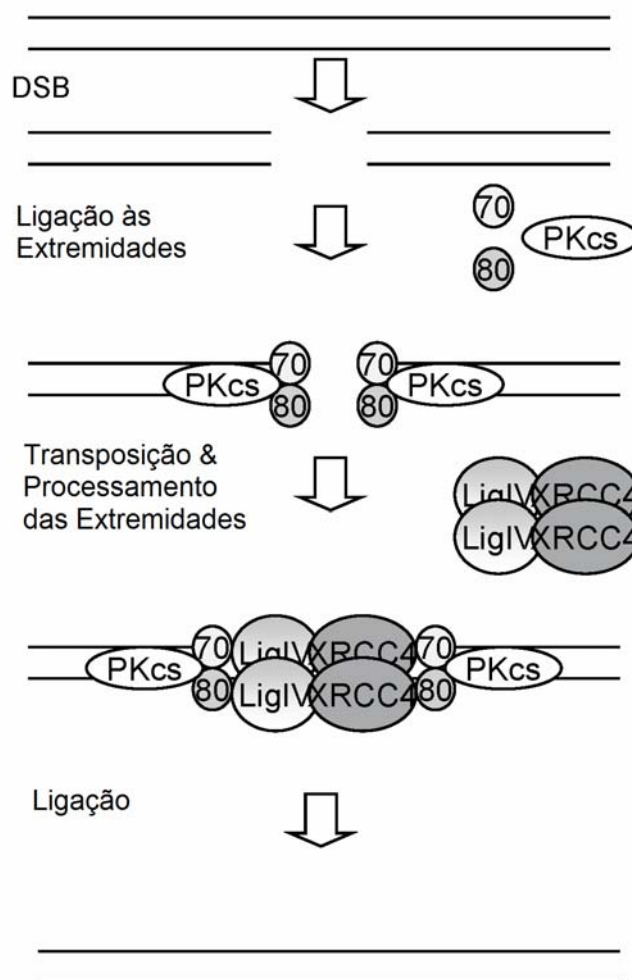
O reparo por Recombinação Homóloga (HR), que está descrito na Figura 8, atua nas quebras duplas presentes logo após a duplicação do DNA e necessita de uma segunda cópia intacta, a qual é invadida pela fita danificada e servirá como molde. Neste processo estão envolvidas mais de 16 proteínas, como BRCA1, BRCA2, conhecidos por estarem envolvidos no desenvolvimento do câncer de mama. Inicialmente o complexo Rad50/Mre11/Nbs1 com a sua atividade exonucleotídica 5'–3' excisa alguns nucleotídeos. As extremidades 3' livres são envoltas por Rad52 para protegê-las contra digestão por endonucleases celulares, além de facilitar o posicionamento de Rad51. Com a proteína Rad51, que tem a habilidade de trocar a fita simples com a mesma seqüência de uma molécula de DNA de fita dupla, e outras proteínas como Rad54, Xrcc2, Xrcc3, as cadeias danificadas formam heteroduplex com cadeias intactas de uma cromátide irmã ou de um cromossomo homólogo e ocorre a síntese por uma DNA polimerase. Então, as cadeias se separam com a resolução das junções de Holliday e as terminações das cadeias reparadas são ligadas pela DNA ligase (Goode *et al.*, 2002; Costa & Menck, 2004). Polimorfismos no gene *RAD51* levam a diferenças na suscetibilidade para o desenvolvimento de leucemia mielóide aguda em resposta a terapia, de câncer de mama e de câncer gástrico (Wang *et al.*, 2001; Jawad *et al.*, 2006; Poplawski, *et al.*, 2006).





**Figura 8.** Esquema da via de Recombinação Homóloga. Com o reconhecimento de quebra de fita dupla há um pareamento entre a fita danificada e sua homóloga que serve de molde para a síntese de DNA. Modificado de San Felippo *et al.* (2008).

Já a recombinação não homologa (NHEJ), que está esquematizado na Figura 9, faz simplesmente a ligação de duas extremidades de dupla fita quebradas que forem encontradas em uma célula, sem o emprego de moldes. As principais proteínas envolvidas neste mecanismo de reparo são KU e DNA-PKcs. A proteína KU reconhece as extremidades livres, ligando-se a elas, para facilitar o acesso de DNA-PKcs à região. Após o recrutamento de Xrcc4 e da DNA ligase IV que efetuarão a junção das extremidades (Goode *et al.*, 2002; Costa & Menck, 2004).



**Figura 9.** Esquema da via de Recombinação Não Homóloga em células de mamíferos. Após o reconhecimento das extremidades, estas são processadas e, em seguida, religadas. Modificado de Pastwa & Blasiak (2003).

### 1.3.4. Variação Populacional de genes de reparo

Alguns genes que codificam as proteínas envolvidas nas vias de reparo apresentam-se polimórficos. Alguns destes polimorfismos alteram a função da proteína e estes genes apresentam freqüências variáveis nas diferentes populações analisadas.

A tabela 4 apresenta exemplos de polimorfismos de genes de reparo em diferentes populações e suas freqüências.

**Tabela 4.** Freqüência de polimorfismos de genes de reparo em diferentes populações.

Gene	Polimorfismo	População	Freqüência do alelo raro	Referência
OGG1	Ser326Cys	Belga	0,210	De Ruyck <i>et al.</i> (2005)
		Noruega	0,270	Hansen <i>et al.</i> (2005)
		Europa	0,200	Hung <i>et al.</i> (2005)
XRCC1	Arg194Trp	Euro-brasileiro	0,070	Rossit <i>et al.</i> (2002)
		Afro-brasileiro	0,090	Rossit <i>et al.</i> (2002)
		Chineses	0,350	Shen <i>et al.</i> (2000)
		Europa	0,070	Hung <i>et al.</i> (2005)
	Arg280His	Europa	0,050	Hung <i>et al.</i> (2005)
	Arg399Gln	Euro-brasileiro	0,370	Rossit <i>et al.</i> (2002)
		Afro-brasileiro	0,220	Rossit <i>et al.</i> (2002)
		Chineses	0,260	Shen <i>et al.</i> (2000)
		Europa	0,350	Hung <i>et al.</i> (2005)
		Itália	0,390	Matullo <i>et al.</i> (2006)
XPC	Lys939Gln	Dinamarca	0,360	Vogel <i>et al.</i> (2005)
XPD	Asp312Asn	Suécia	0,370	Hou <i>et al.</i> (2002)
	Lys751Gln	Canadá	0,035	Casson <i>et al.</i> (2005)
Rad51	G135C	Austrália	0,076	Webb <i>et al.</i> (2005)
		Itália	0,062	Voso <i>et al.</i> (2007)
XRCC4	Ile401Thr	Canadá	0,050	Ford <i>et al.</i> (2000)
		Reino Unido	0,050	Relton <i>et al.</i> (2004)

Uma análise dos níveis de dano no DNA, medido por quebras em fita simples, em populações da Europa central, mostrou que polimorfismos nos genes *XPD* e *XPG* apresentaram associação com as quebras. Entretanto, quando os autores realizaram uma análise conjunta relacionando polimorfismos em genes de reparo e polimorfismos em genes de metabolização, foi verificado um aumento no nível de associação, principalmente quando analisados estes genes de reparo em combinação com os genótipos dos genes de metabolização *GSTM1* e *GSTT1* (Naccarati *et al.*, 2005). Este trabalho ressalta a importância de se considerar a resposta individual a exposição a xenobióticos como uma característica dependente de várias vias genéticas.

Nosso grupo de pesquisa já estudou, em uma amostra de viticultores (a mesma do presente trabalho), a influência dos polimorfismos em genes de metabolização (*GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*, *CYP1A1*, *CYP2E1* e *PON1*) nos resultados dos Testes Cometa e Micronúcleo (Silva *et al.*, 2008). Os resultados demonstraram que a amostra exposta apresentou índice e frequência de dano (ID e FD) e de frequência de MN elevadas em comparação aos não expostos. Na análise considerando os genótipos dos genes de metabolização estudados, o polimorfismo no códon 192 do gene *PON1* pareceu influenciar numa resposta relacionada com a metabolização dos agrotóxicos. Assim, com este trabalho, pretendemos estudar a influência dos polimorfismos em genes de reparo.

## 2. OBJETIVOS

A viticultura é uma importante atividade econômica desenvolvida na região nordeste do estado do Rio Grande do Sul. Na viticultura, pesticidas são extensamente utilizados. Nosso grupo demonstrou, anteriormente, aumento significativo nos níveis de dano nos indivíduos expostos a pesticidas bem como a influência do polimorfismo do gene de metabolização *PON1\*Gln192Arg* na indução destes danos (Silva *et al.*, 2008). Uma vez que os polimorfismos em genes de reparo são, juntamente com os polimorfismos de genes de metabolização, considerados biomarcadores de suscetibilidade e responsáveis pela modulação da resposta individual a exposição a xenobióticos, este trabalho teve como principais objetivos:

**2.1.** Determinar as frequências dos seguintes polimorfismos em genes de reparo em uma amostra da região nordeste do Rio Grande do Sul:

**2.1.1.** BER – *OGG1\*Ser326Cys* e *XRCC1\*Arg194Trp*

**2.1.2.** NER – *XPD\*Ile199Met* e *Asp312Asn*

**2.1.3.** HR – *RAD51\*G135C*

**2.1.4.** NHEJ – *XRCC4\*Ile 401Thr*

**2.2.** Analisar a influência destes polimorfismos (6) nos resultados de biomarcadores de exposição (Teste Cometa) e de efeito (Teste do MN) em uma amostra de viticultores expostos a pesticidas da região de Caxias do Sul – RS.

**2.3.** Realizar uma análise conjunta destes polimorfismos em genes de reparo com o polimorfismo do gene de metabolização/detoxificação *PON1\*Gln192Arg*.

### 3. MATERIAIS & MÉTODOS

#### 3.1. Caracterização da amostra

Todas as amostras que compõem um banco de DNA não identificado disponível em nosso laboratório (Laboratório de Imunogenética - Departamento de Genética/UFRGS) sob responsabilidade da Dra. Kátia Kvitko, foram coletadas em duas etapas, durante o período de outubro a novembro dos anos de 2001 e 2002, períodos correspondentes às aplicações de pesticidas nas plantações. As coletas foram realizadas em propriedades e no Sindicato dos Agricultores da região de Caxias do Sul – RS. A montagem deste banco teve aprovação de comitê de ética da Universidade de Caxias (UCS) e Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Na época das coletas, todos os indivíduos assinaram um termo de consentimento informado (Anexo 1) autorizando as pesquisas com polimorfismos de genes de suscetibilidade, Ensaio Cometa e o Teste de MN. Todos os trabalhadores responderam a entrevista sobre saúde ocupacional (versão em português do questionário da *International Commission for Protection against Environmental Mutagens and Carcinogens*; Anexo 2) (Carrano & Natarajan, 1988). Todas as coletas de sangue foram realizadas com o uso de *vacutainers* (com heparina e EDTA), processadas rapidamente para evitar problemas com a estocagem.

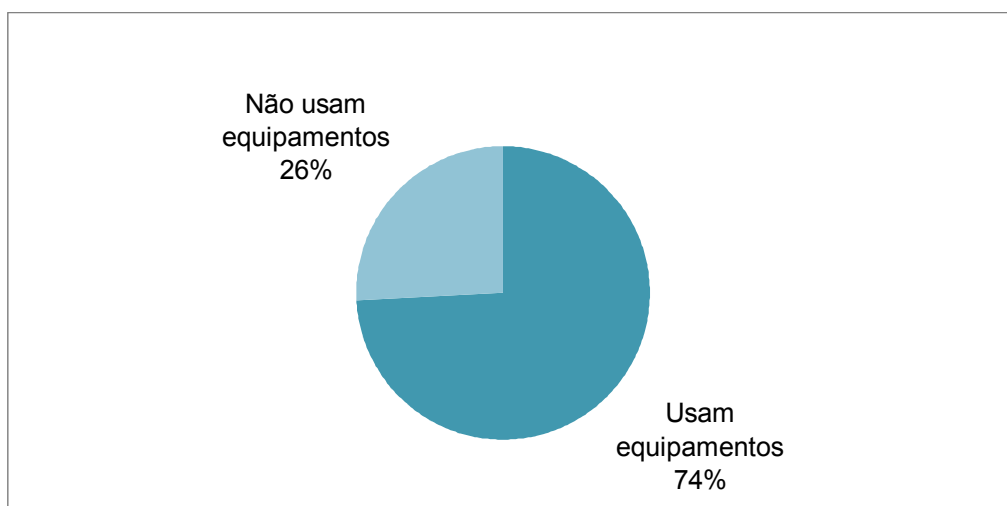
Neste estudo foram envolvidos ao todo 173 indivíduos (homens) da região de Caxias do Sul (RS), sendo 108 agricultores e 65 indivíduos controle (não expostos a pesticidas). O grupo controle foi coletado no mesmo período do grupo exposto. O tempo médio de exposição do grupo dos agricultores foi

de  $29,8 \pm 14,2$  anos de exposição, sendo que no período das coletas eles se expunham pelo menos duas vezes por semana. A Tabela 5 apresenta as principais características dos grupos estudados. Quanto ao uso de equipamentos de proteção, 74 % alegaram fazer uso de algum tipo de proteção (luvas, capas, óculos, botas, máscaras...) (Figura 10).

**Tabela 5.** Características demográficas dos indivíduos estudados

	Não Expostos	Expostos
Amostra	65	108
Idade (anos)		
Média $\pm$ D.P.	$37,8 \pm 10,6$	$41,6 \pm 11,6^*$
Hábito Tabagista		
Não Fumantes	64 (98,5%)	100 (92,6%)
Fumantes <sup>a</sup>	1 (1,5%)	8 (7,4%)
Tempo de exposição		
Média $\pm$ D.P.	-	$29,8 \pm 14,2$

D.P.= Desvio Padrão. <sup>a</sup> Fumam 5 ou mais cigarros por dia ; \* $P=0,032$  (Teste t de Student) comparado com grupo de Não Expostos.



**Figura 10.** Gráfico demonstrando a utilização de equipamentos de proteção pelos agricultores.

### **3.2. Detecção dos genótipos por PCR/ RFLP**

Os sistemas polimórficos foram analisados pela técnica de PCR/RFLP. Os *primers*, bem como, as enzimas de restrição específicos, foram utilizados conforme descritos na literatura (Tabela 6). As reações de amplificação foram padronizadas no Laboratório de Imunogenética, UFRGS:



**Tabela 6.** Vias, genes, polimorfismos que foram estudados, com *primers* utilizados.

Via de Reparo	Gene	Polimorfismo	Primers		Enzima de restrição	Referência
			Direto	Reverso		
BER	<i>OGG1</i>	<i>Ser326Cys</i>	GTTCCGTGTGAAGGAGGAG	CTTGGAGGTGCTGCCTATG	<i>Fnu4HI</i>	De Ruyck <i>et al.</i> (2005).
	<i>XRCC1</i>	<i>Arg194Trp</i>	GCCCCGTCCCAGGTA	AGCCCCAAGACCCTTTCACT	<i>PvuII</i>	Lunn <i>et al.</i> (1999)
NER	<i>XPD</i>	<i>Ile199Met</i>	CTGTTGGTGGGTGCCCCGTATCTGTT GGTCT	TAATATCGGGGCTCACCCCTGCAGCA CTTCCT	<i>DpnI</i>	Lunn <i>et al.</i> (2000)
		<i>Asp312Asn</i>	CTGTTGGTGGGTGCCCCGTATCTGTT GGTCT	TAATATCGGGGCTCACCCCTGCAGCA CTTCCT	<i>StyI</i>	Lunn <i>et al.</i> (2000)
HR	<i>RAD51</i>	<i>G135C</i>	GGGAACTGCAACTCATCTGGGTT	TGGCACGCGCCCGAC	<i>BsrDI</i>	Wang <i>et al.</i> (2001)
NHEJ	<i>XRCC4</i>	<i>Ile401Thr</i>	CTCAGAAGAAATTGTGTATGCT	ACCACAAGCAAACCTGTGTACAC	<i>BstNI</i>	Relton <i>et al.</i> (2004)

### 3.2.1. *OGG1*\*Ser326Cys

A reação para a amplificação do fragmento de 672pb do gene *OGG1*, foi feita num volume total de 25µl e consta de:

100ng de DNA genômico

10pmol de cada *primer*

Tampão 1X (Invitrogen)

1,5mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen)

1µM de cada dNTP

1,0U *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen).

A condição de amplificação foi: 5 minutos de desnaturação inicial a 95°C, seguidos de 35 ciclos de 40 segundos a 95°C, 40 segundos a 58°C e 30 segundos a 72°C, e mais 5 minutos de extensão final a 72°C. Após a amplificação os fragmentos de 672pb foram clivados com 1U da enzima de restrição *Fnu4HI*, por 8hs a 37°C, sendo a visualização dos genótipos realizada em gel de agarose 3%, corado com brometo de etídeo.

### 3.2.2. *XRCC1*\*Arg194Trp

Na amplificação do fragmento de 504pb do gene *XRCC1*, em uma reação com volume total de 25 µl, foram utilizados:

100ng de DNA genômico

10pmol de cada *primer*

Tampão 1X (Invitrogen)

1,5mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen)

1μM de cada dNTP

1,0U *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen).

O programa de temperatura utilizado foi: 2 minutos de desnaturação inicial a 95°C, 12 ciclos em *touchdown* de 20 segundos a 95°C, 15 segundos a 67°C (decrecendo em uma taxa de 1°C por ciclo) e 1 minuto a 72°C, seguidos de 24 ciclos de 95°C por 40 segundos, 40 segundos a 55°C, 30 segundos a 72°C e mais 10 minutos de extensão final a 72°C. Os fragmentos amplificados foram clivados com 1U da enzima de restrição PvuII a 37°C, por 8hs. A análise dos genótipos foi feita em gel de agarose 3% corado com brometo de etídeo.

### **3.2.3. *XPD\*Ile199Met* e *XPD\*Asp312Asn***

O fragmento de 757pb do gene XPD, onde estão os dois códonos polimórficos, foi amplificado em reação com volume total de 50μl, sob as seguintes condições:

100ng de DNA genômico

40pmol de cada *primer*

Tampão 1X (Invitrogen)

1,5mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen)

4μM de cada dNTP

2,0U *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen).

O programa de amplificação foi: 5 minutos de desnaturação inicial a 95°C, seguidos de 35 ciclos de 95°C por 45 segundos, 30 segundos a 63°C, 45

segundos a 72°C e mais 5 minutos de extensão final a 72°C. Para determinação do polimorfismo do códon 199, foi feita a clivagem dos fragmentos amplificados com 1U da enzima de restrição *DpnII* a 37°C por 8hs e a análise foi feita em gel de agarose 3% corado com brometo de etídeo. Já o polimorfismo do códon 312, foi determinado com a digestão deste fragmento com 10U da enzima *StyI* por 8hs a 37°C e analisados em gel de acrilamida 6% corado com nitrato de prata.

#### **3.2.4. RAD51\*G135C**

A amplificação do fragmento de 107pb do gene *RAD51* foi feita em uma reação de 25µl, utilizando as seguintes condições:

100ng de DNA genômico

10pmol de cada *primer*

Tampão 1X (Invitrogen)

1,5mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen)

0,8µM de cada dNTP

1,0U *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen).

As condições de temperatura utilizadas foram: 94°C por 5minutos para desnaturação inicial, 35 ciclos de 30 segundos de 94°C, 62 °C por 30 segundos, 72 °C por 30 segundos, seguidos de 5 minutos a 72 °C, para a extensão final. Os fragmentos amplificados passaram pela digestão com 1U da enzima *BsrDI* a 65°C por 8hs, sendo analisado, posteriormente, em gel de agarose 3% corado com brometo de etídeo.

### 3.2.5. XRCC4\*Ile 401Thr

A reação de amplificação do fragmento de 277pb foi realizada no volume total de 25µl e teve:

100ng de DNA genômico

10pmol de cada *primer*

Tampão 1X (Invitrogen)

1,5mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen)

0,8µM de cada dNTP

1,0U *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen).

O programa de temperatura usado para a amplificação do fragmento de 277pb foi: 94°C por 5 minutos, 30ciclos de 94°C por 30 segundos, 30 segundos a 52°C, 30 segundos a 72°C, e extensão final de 72°C por 5 minutos. Para a determinação do genótipo, o fragmento foi digerido com a enzima de restrição *BstNI*, a 60°C, por 8hs.

### 3.3. Teste de Micronúcleo

Para cada amostra de sangue, foram feitas duplicatas de cultura de linfócitos adicionando 0,3ml de sangue total em 5mL de meio RPMI 1640 (Nutricell, Campinas – SP, Brasil), que continha 1% (v/v) de fitoemaglutinina. Os frascos foram incubados a 37°C por 44 horas antes da adição de citocalasina B (Sigma), seguindo a incubação até o tempo de incubação totalizar 72 horas, como descrito por Fenech *et al.* (1999). Após a incubação, linfócitos passaram por centrifugação a 800rpm por 8min, fixados em 3:1 (v/v)

metanol/ ácidos acético, colocados em lâmina de microscópio limpa, e corados com 5% (v/v) de Giemsa. De cada amostra, 2000 células (1000 de cada lâmina, sendo duas por cultura) foram contadas para a presença de MN, utilizou-se microscópio ótico com aumento de 200-1000x. Todas as lâminas foram codificadas para uma análise cega.

### **3.4. Ensaio Cometa**

O Ensaio Cometa alcalino foi realizado como descrito por Singh *et al.* (1988), com modificações sugeridas por Tice *et al.* (2000). Células sanguíneas (5 $\mu$ L) foram embebidas em 95 $\mu$ L de agarose com baixo ponto de fusão, e após a solidificação da agarose, as lâminas foram embebidas em tampão de lise (2,5 M NaCl, 100mM EDTA, 10mM Tris, pH 10,0 – 10,5) contendo 1% (v/v) de Triton X-100 e 10% (v/v) de dimetilsulfóxido (DMSO) recém acrescentados por no mínimo 1 hora e no máximo 2 semanas. Após o tratamento com o tampão de lise, as lâminas foram incubadas em solução tampão alcalina (300mM NaOH e 1mM EDTA, pH>13) por 20 minutos, e o DNA foi submetido a eletroforese a 25 volts por 20 minutos (0,90 V/cm) e 300mA, após as lâminas foram neutralizadas com a solução tampão 0,4M Tris (pH 7,5) e o DNA corado com brometo de etídeo (2 $\mu$ g/ml). O procedimento e eficiência da eletroforese de cada corrida foram checadas utilizando-se controles internos negativo e positivo, que consistem de células humanas coletadas em laboratório. O controle positivo era 50  $\mu$ L de sangue misturado com 13  $\mu$ L (8x10<sup>-5</sup> M) metilmetanosulfonato (CAS 66-27-3- Sigma, St. Louis, MO, EUA), sendo incubados por 2 horas a 37°C. Cada corrida de eletroforese foi considerada

válida somente se os controles negativo e positivo produzissem os resultados esperados.

Imagens de 100 células selecionadas randomicamente (50 células de cada lâmina em replicata) foram analisadas para cada indivíduo usando microscópio de fluorescência equipado com filtro de excitação 12 nm BP546 e filtro de barreira 590 nm. Dois parâmetros foram avaliados: índice de dano (ID), no qual cada célula foi designada a uma das 5 categorias (de 0 = sem dano a 4 = dano máximo) de acordo com o tamanho e a forma da cauda, os valores obtidos para cada indivíduo podem variar de 0 (0x100) a 400 (4x100); e frequência de dano FD, calculada com a porcentagem de células com dano. Orientações e recomendações internacionais para o Ensaio Cometa consideram que a contagem visual dos cometas é um método de avaliação com validade. Embora o parâmetro ID seja subjetivo, ele é altamente correlacionado com a análise das imagens por computador.

### **3.5. Análise Estatística**

As normalidades da distribuição das variáveis (ID, FD e MN) foram testadas pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. As frequências gênicas e genóticas foram estimadas pela contagem, e Equilíbrio de Hardy-Weinberg foi testado com o teste do  $\chi^2$ . As análises estatísticas das diferenças de ID, FD e MN entre os diferentes genótipos foram realizadas com o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Todas as análises foram feitas utilizando o pacote estatístico SPSS15.0.

#### 4. RESULTADOS

Não foi encontrada diferença significativa na média das idades entre os grupos não exposto e exposto. Alguns indivíduos foram considerados fumantes (fumavam 5 ou mais cigarros por dia) em ambos os grupos, mas estes não apresentaram diferença significativa quanto aos biomarcadores de exposição e efeito em relação aos não fumantes do mesmo grupo.

A Tabela 7 traz a distribuição dos genótipos, assim como as frequências alélicas e genóticas de cada um dos polimorfismos estudados. Os sistemas *OGG1*, *XRCC1* e *XPB* apresentaram frequências genóticas que estão de acordo com o Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Os sistemas *XRCC4 401* e *Rad51 135* não estão de acordo com o esperado para o Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

A análise da influência dos polimorfismos estudados nos biomarcadores de exposição e efeito dos grupos não-exposto e exposto está apresentada na Tabela 8. O alelo *XPB 199 Met* apresentou uma frequência muito baixa (0,003), impossibilitando a análise da influência deste polimorfismo em ID e FD, no Ensaio Cometa, e na frequência de MN, no Teste de MN. A Tabela 9 traz os resultados das análises combinadas considerando o genótipo do gene de metabolização *PON1* e um gene de reparo.



**Tabela 7.** Distribuição das freqüências genóticas e freqüências dos alelos variantes (em negrito) de cada um dos polimorfismos estudados.

Genótipos/ <b>Alelo Mutante</b>	N (Freqüência) / <b>Freqüência</b>
<i>OGG1*326</i>	
<i>Ser/Ser</i>	103 (62,1)
<i>Ser/Cys</i>	57 (34,3)
<i>Cys/Cys</i>	6 (3,6)
<b><i>OGG1Cys</i></b>	<b>20,8</b>
 <i>XRCC1*194</i>	
<i>Arg/Arg</i>	138 (83,6)
<i>Arg/Trp</i>	27 (16,4)
<b><i>XRCC1Trp</i></b>	<b>8,2</b>
 <i>XPB*199</i>	
<i>Ile/Ile</i>	156 (99,4)
<i>Ile/Met</i>	1 (0,6)
<i>Met/Met</i>	0 (0,0)
<b><i>XPB Met</i></b>	<b>0,3</b>
 <i>XPB*312</i>	
<i>Asp/Asp</i>	60 (40,8)
<i>Asp/Asn</i>	72 (49,0)
<i>Asn/Asn</i>	15 (10,2)
<b><i>XPB Asn</i></b>	<b>34,7</b>
 <i>XRCC4*401</i>	
<i>Ile/Ile</i>	150 (90,4)
<i>Ile/Thr</i>	13 (7,8)
<i>Thr/Thr</i>	3 (1,8)
<b><i>XRCC4 Thr</i></b>	<b>5,7</b>
 <i>Rad51*135</i>	
<i>G/G</i>	130 (89,1)
<i>G/C</i>	11 (7,5)
<i>C/C</i>	5 (3,4)
<b><i>Rad51 C</i></b>	<b>7,2</b>

**Tabela 8.** Efeito dos genótipos individuais nos biomarcadores de exposição e efeito dos não-expostos e expostos (média ± D.P.)

Genótipos	Ensaio Cometa (200 leucócitos/indivíduo)		Micronúcleo (MN – 2000 células/indivíduo)
	Índice de Dano (ID – 0-400)	Frequência de Dano (FD – %)	
<b>Grupo Não Exposto</b>			
<i>OGG1 Ser/Ser</i>	5,13 ± 6,85 (n=39)	2,08 ± 2,44 (n=39)	4,57 ± 6,1 (n=35)
<i>OGG1 Cys/ –</i>	3,37 ± 2,91 (n=19)	1,74 ± 1,33 (n=19)	3,35 ± 3,04 (n=17)
<i>XRCC1 Arg/Arg</i>	4,84 ± 6,15 (n=51)	2,06 ± 2,23 (n=51)	4,40 ± 5,65 (n=51)
<i>XRCC1 Arg/Trp</i>	1,89 ± 2,62 (n=9)	1,00 ± 1,00 (n=9)	2,44 ± 1,59 (n=9)
<i>XPD 312 Asp/Asp</i>	2,50 ± 3,84 (n=30) <sup>a</sup>	1,20 ± 1,30 (n=30) <sup>b</sup>	4,29 ± 6,46 (n=28)
<i>XPD 312 Asn/ –</i>	5,00 ± 5,48 (n=28)	2,18 ± 1,89 (n=28)	4,38 ± 4,68 (n=24)
<i>Rad51 G/G</i>	4,74 ± 5,66 (n=35)	1,86 ± 1,80 (n=35)	4,94 ± 4,52 (n=31)
<i>Rad51 C/ –</i>	6,00 ± 6,16 (n=9)	2,67 ± 2,00 (n=9)	2,50 ± 1,41 (n=8)
<i>XRCC4 Ile/Ile</i>	4,30 ± 5,72 (n=57)	1,88 ± 2,14 (n=57)	4,22 ± 5,35 (n=51)
<i>XRCC4 Thr/ –</i>	6,33 ± 9,24 (n=3)	2,33 ± 2,31 (n=3)	1,67 ± 0,58 (n=8)
<b>Grupo Exposto</b>			
<i>OGG1 Ser/Ser</i>	19,00 ± 11,23 (n=64) <sup>c</sup>	10,44 ± 3,97 (n=64) <sup>d</sup>	7,98 ± 4,95 (n=64)
<i>OGG1 Cys/ –</i>	23,55 ± 13,45 (n=42)	12,26 ± 3,93 (n=42)	6,57 ± 4,64 (n=42)
<i>XRCC1 Arg/Arg</i>	21,26 ± 12,80 (n=88)	11,28 ± 4,20 (n=88)	7,62 ± 5,00 (n=85)
<i>XRCC1 Arg/Trp</i>	17,55 ± 9,47 (n=18)	10,20 ± 3,21 (n=18)	6,47 ± 3,95 (n=18)
<i>XPD Asp/Asp</i>	21,93 ± 15,62 (n=30)	11,43 ± 4,77 (n=30)	6,21 ± 4,65 (n=28)
<i>XPD Asn/ –</i>	19,93 ± 10,74 (n=59)	11,05 ± 3,52 (n=59)	7,95 ± 5,15 (n=59)
<i>Rad51 G/G</i>	21,04 ± 12,77 (n=95)	11,22 ± 4,15 (n=95)	7,02 ± 4,78 (n=93)
<i>Rad51 C/ –</i>	18,29 ± 6,60 (n=7)	10,29 ± 2,22 (n=7)	10,33 ± 4,59 (n=6)
<i>XRCC4 Ile/Ile</i>	20,89 ± 12,82 (n=93)	11,30 ± 4,01 (n=93)	6,91 ± 4,41 (n=90) <sup>e</sup>
<i>XRCC4 Thr/ –</i>	20,15 ± 12,93 (n=13)	10,15 ± 4,22 (n=13)	10,85 ± 6,41 (n=13)

<sup>a</sup> Significante em relação ao genótipo variante (homozigoto e/ou heterozigoto) do mesmo grupo , P=0,028,

<sup>b</sup> Significante em relação ao genótipo variante (homozigoto e/ou heterozigoto) do mesmo grupo , P=0,035,

<sup>c</sup> Significante em relação ao genótipo variante (homozigoto e/ou heterozigoto) do mesmo grupo , P=0,032,

<sup>d</sup> Significante em relação ao genótipo variante (homozigoto e/ou heterozigoto) do mesmo grupo , P=0,009,

<sup>e</sup> Significante em relação ao genótipo variante (homozigoto e/ou heterozigoto) do mesmo grupo , P=0,024.

**Tabela 9.** Efeito dos genótipos de reparo combinados com o genótipo de *PON1* nos biomarcadores de efeito e de exposição

Biomarcadores	Genótipos de Reparo	<i>PON Gln/Gln</i>	<i>PON Arg/-</i>	P
<b>ID</b>	<i>OGG1 Ser/Ser</i>	17,04 ± 9,47 (n=28)	20,84 ± 13,19 (n=31)	0,456
	<i>OGG1 Cys/ -</i>	25,00 ± 15,07 (n=20)	25,65 ± 13,01 (n=15)	0,657
	P	<b>0,029</b>	0,136	
	<i>XRCC1 Arg/Arg</i>	19,76 ± 12,38 (n=46)	23,46 ± 13,51 (n=39)	0,148
	<i>XRCC1 Arg/Trp</i>	19,29 ± 12,24 (n=7)	19,90 ± 8,67 (n=10)	0,813
	P	0,748	0,345	
	<i>XPD Asp/Asp</i>	18,38 ± 6,31 (n=13)	24,65 ± 19,85 (n=17)	0,721
	<i>XPD Asn/ -</i>	20,74 ± 10,69 (n=31)	19,04 ± 10,92 (n=28)	0,593
	P	0,729	0,916	
	<i>Rad51 G/G</i>	21,26 ± 9,97 (n=46)	20,84 ± 15,04 (n=49)	0,171
	<i>Rad51 C/ -</i>	16,80 ± 4,87 (n=5)	22,00 ± 11,31 (n=31)	0,699
	P	0,374	0,644	
<b>FD</b>	<i>XRCC4 Ile/Ile</i>	21,26 ± 9,98 (n=46)	20,53 ± 14,28 (n=47)	0,198
	<i>XRCC4 Thr/ -</i>	17,57 ± 7,21 (n=7)	23,17 ± 17,85 (n=6)	0,830
	P	0,371	0,795	
	<i>OGG1 Ser/Ser</i>	9,89 ± 4,13 (n=28)	10,87 ± 4,10 (n=31)	0,451
	<i>OGG1 Cys/ -</i>	12,50 ± 4,14 (n=20)	13,20 ± 3,78 (n=15)	0,657
	P	<b>0,043</b>	<b>0,037</b>	
	<i>XRCC1 Arg/Arg</i>	10,78 ± 4,34 (n=46)	12,05 ± 4,04 (n=39)	0,269
	<i>XRCC1 Arg/Trp</i>	11,00 ± 3,16 (n=7)	10,00 ± 3,46 (n=10)	0,813
	P	0,867	0,308	
	<i>XPD Asp/Asp</i>	10,92 ± 3,55 (n=13)	11,82 ± 5,60 (n=17)	0,916
	<i>XPD Asn/ -</i>	11,19 ± 3,22 (n=31)	10,89 ± 3,87 (n=28)	0,737
	P	0,632	0,851	
<b>MN</b>	<i>Rad51 G/G</i>	11,13 ± 3,38 (n=46)	11,31 ± 4,81 (n=49)	0,964
	<i>Rad51 C/ -</i>	10,80 ± 2,39 (n=5)	9,00 ± 1,41 (n=2)	0,324
	P	0,975	0,451	
	<i>XRCC4 Ile/Ile</i>	11,41 ± 3,33 (n=46)	11,19 ± 4,62 (n=47)	0,611
	<i>XRCC4 Thr/ -</i>	9,29 ± 3,20 (n=7)	11,17 ± 5,31 (n=6)	0,518
	P	0,174	0,933	
	<i>OGG1 Ser/Ser</i>	7,56 ± 4,76 (n=27)	8,52 ± 5,21 (n=29)	0,521
	<i>OGG1 Cys/ -</i>	6,65 ± 5,59 (n=20)	6,47 ± 3,23 (n=15)	0,633
	P	0,354	0,258	
	<i>XRCC1 Arg/Arg</i>	7,02 ± 5,01 (n=45)	7,97 ± 4,96 (n=37)	0,319
	<i>XRCC1 Arg/Trp</i>	7,57 ± 5,13 (n=7)	5,90 ± 3,28 (n=10)	0,475
	P	0,733	0,274	
<b>MN</b>	<i>XPD Asp/Asp</i>	6,83 ± 5,11 (n=12)	5,75 ± 4,37 (n=16)	0,591
	<i>XPD Asn/ -</i>	9,10 ± 5,04 (n=31)	6,68 ± 5,06 (n=28)	0,058
	P	0,132	0,598	
	<i>Rad51 G/G</i>	8,22 ± 5,02 (n=45)	5,90 ± 4,31 (n=48)	<b>0,021</b>
	<i>Rad51 C/ -</i>	11,50 ± 4,36 (n=4)	8,00 ± 5,66 (n=2)	0,533
	P	0,181	0,441	
<b>MN</b>	<i>XRCC4 Ile/Ile</i>	8,02 ± 4,58 (n=44)	5,85 ± 4,01 (n=46)	<b>0,022</b>
	<i>XRCC4 Thr/ -</i>	11,71 ± 6,24 (n=7)	9,83 ± 7,06 (n=6)	0,628
	P	0,104	0,135	

#### 4.1. Polimorfismos da via BER

A análise da influência dos genótipos da via BER nos biomarcadores de exposição, entre indivíduos expostos, demonstrou que os indivíduos com o genótipo *OGG1* Ser/Ser apresentaram uma redução significativa em ID e FD em comparação com os indivíduos com o genótipo *OGG1* Cys/– (P=0,032 e P=0,009, respectivamente). Enquanto que nos biomarcadores de efeito (Teste de MN), o genótipo *OGG1*\*326 não apresentou diferenças estatisticamente significativas (Tabela 8).

Resultados quanto à influência dos genótipos de *XRCC1*\*194 não apresentaram diferenças significativas em ID, FD e MN. Contudo, observou-se que os melhores resultados nos biomarcadores de exposição e efeito foram dos indivíduos com genótipo *XRCC1*\*194 Arg/Trp, apesar de não terem sido estatisticamente significantes. Esta tendência ocorre tanto no grupo de indivíduos não-expostos como nos expostos (Tabela 8).

Na análise combinada considerando apenas indivíduos expostos com genótipo *PON1* Gln/Gln (genótipo que apresentou influência no aumento de micronúcleos; Anexo 3; Silva *et al.*, 2008), os indivíduos com o genótipo *OGG1*\*326 selvagem (Ser/Ser) demonstraram menores ID e FD em relação aos indivíduos portadores do alelo mutante (genótipo Cys/–) (P=0,029 e P=0,043, respectivamente). Neste grupo de indivíduos, *PON1* Gln/Gln, os genótipos de *XRCC1*\*194 não mostram influência nos níveis de ID, FD e MN. Embora a diferença antes observada entre os genótipos *PON* não se observa mais quando combinados os genótipos *PON* e *XRCC1* (Tabela 9).

Entre os indivíduos expostos com o genótipo *PON Arg/ -*, foi observada redução no nível de FD dos indivíduos com genótipo *OGG1\*Ser/Ser*, quando comparado com indivíduos *OGG1 Cys/ -* ( $p=0,037$ ). Em relação à análise com *XRCC1*, nenhuma diferença nos níveis de dano foi verificada entre os portadores dos diferentes genótipos de *XRCC1 194 (Arg /Arg e Arg/Trp)*. (Tabela 9).

Ao considerar os indivíduos expostos com os diferentes genótipos de *OGG1\*326* separadamente, não foi observada diferença significativa nos níveis dos biomarcadores de efeito e exposição na comparação dos genótipos de *PON1\*192 (Gln/Gln x Arg/ -)*. A ausência de significância estatística se manteve quando comparados os níveis de ID, FD e frequência de MN dos indivíduos de diferentes genótipos de *PON1\*192*, nos grupos dos diferentes genótipos *XRCC1\*194* (Tabela 9).

#### **4.2. Polimorfismos da via NER**

No grupo de indivíduos não-expostos, os genótipos de *XPD\*312 (Asp/Asp x Asn/ -)* apresentaram diferenças significativas quanto aos resultados de ID e de FD, sendo que indivíduos com o genótipo selvagem (*Asp/Asp*) apresentaram melhores resultados para os dois biomarcadores ( $P=0,028$  e  $P=0,035$ , respectivamente). Enquanto que entre os indivíduos expostos nenhuma diferença foi observada (Tabela 8).

Nas análises com a combinação de genótipos, não foi verificada nenhuma diferença estatisticamente significativa, embora se perceba redução no número de micronúcleos observados para indivíduos com o genótipo *XPD*

*Asp/Asp*, principalmente entre os indivíduos com o genótipo *PON Gln/Gln* (Tabela 9).

### **4.3. Polimorfismo da via HR**

Na análise da influência dos genótipos de *Rad51\*135* nos níveis de ID, FD e MN, nenhuma diferença estatística foi encontrada nos grupos de indivíduos não expostos e expostos entre os diferentes genótipos (Tabela 8).

Na análise combinada, a ausência de significância estatística se manteve quando se realizou a análise com os indivíduos expostos separados em dois grupos, conforme o genótipo *PON1\*192*, comparando os níveis dos biomarcadores de exposição e efeito entre os indivíduos com diferentes genótipos de *Rad51\*135*, apesar de ser observada uma redução nos níveis de MN dos indivíduos com o genótipo *Rad51G/G*. Ao analisar apenas os indivíduos expostos com o genótipo *Rad51G/G*, observou-se diferença estatisticamente significativa na frequência de MN quando comparados os indivíduos com os diferentes genótipos de *PON1\*192*. Quando os indivíduos com o genótipo *PON1 (Arg/ -)* apresentaram menor frequência de MN em relação aos com genótipo *PON1 Gln/Gln* ( $P=0,021$ ). Considerando apenas os indivíduos com o genótipo *Rad51 C/ -*, nenhuma diferença estatística foi observada nos níveis dos biomarcadores de exposição e efeito entre os diferentes genótipos de *PON1\*192*. Entretanto, pode se perceber que a mesma tendência ocorre, os genótipos com a presença do alelo variante que tem menor frequência de MN (Tabela 9).

#### **4.4. Polimorfismo da Via NHEJ**

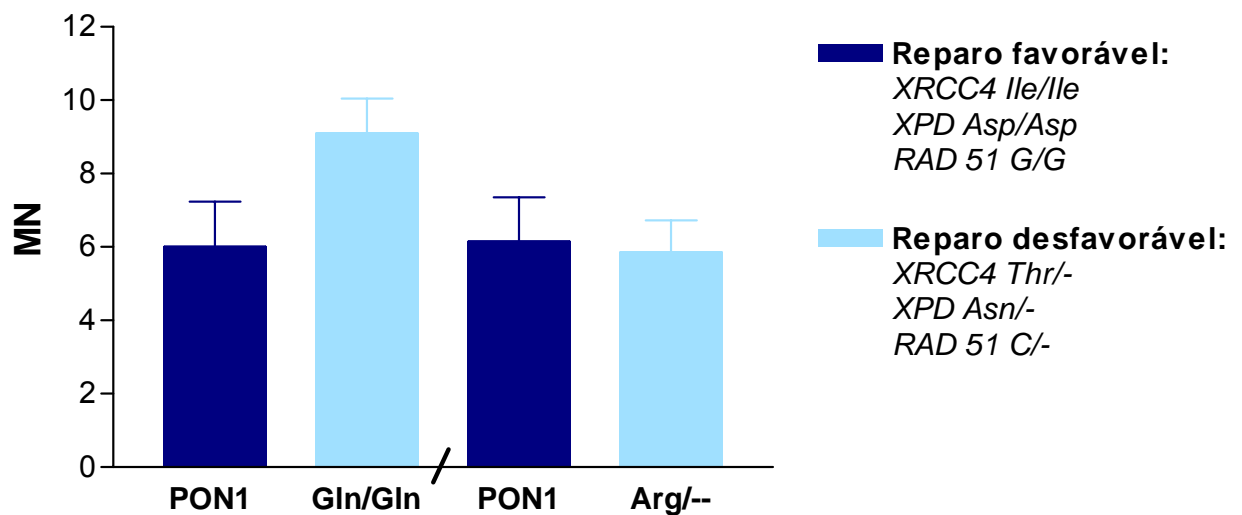
Os genótipos de *XRCC4\*401* apresentaram influência nas freqüências de MN nos indivíduos expostos ( $P=0,024$ ), porém para os demais biomarcadores, ID e FD, o mesmo não foi observado. Os indivíduos com o genótipo *XRCC4* selvagem (*Ile/Ile*) tiveram menores freqüências de MN em relação aos indivíduos com a presença do mutante (*Thr/ -*) (Tabela 8).

Na análise combinada, não foi encontrada nenhuma diferença significativa nos níveis de dano entre os dois genótipos *XRCC4* em nenhum dos grupos conforme o genótipo de *PON1*. Considerando apenas os indivíduos expostos com o genótipo *XRCC4 Ile/Ile*, os indivíduos com o genótipo *PON1 Arg/ -* tiveram menor freqüência de MN em relação aos indivíduos com o genótipo *PON1 Gln/Gln*, de maneira estatisticamente significativa ( $P=0,022$ ). Entre os indivíduos com o genótipo *XRCC4 Thr/ -*, não foi observada nenhuma diferença significativa estatisticamente nos níveis dos biomarcadores de exposição e efeito na comparação dos genótipos de *PON1*. Contudo, novamente pode se perceber que o genótipo *PON1 Arg/ -* apresentou menor freqüência de MN (Tabela 9).

#### **4.5. Associações dos Danos com os Genótipos Favoráveis e Desfavoráveis**

Como se observou que nas análises dos genótipos individuais ou combinados com o genótipo *PON1*, os polimorfismos que parecem influenciar freqüência de MN, mesmo que nem sempre apresentaram significância estatística foram os seguintes polimorfismos: *XPB*, *Rad51*, *XRCC4*. Realizou-

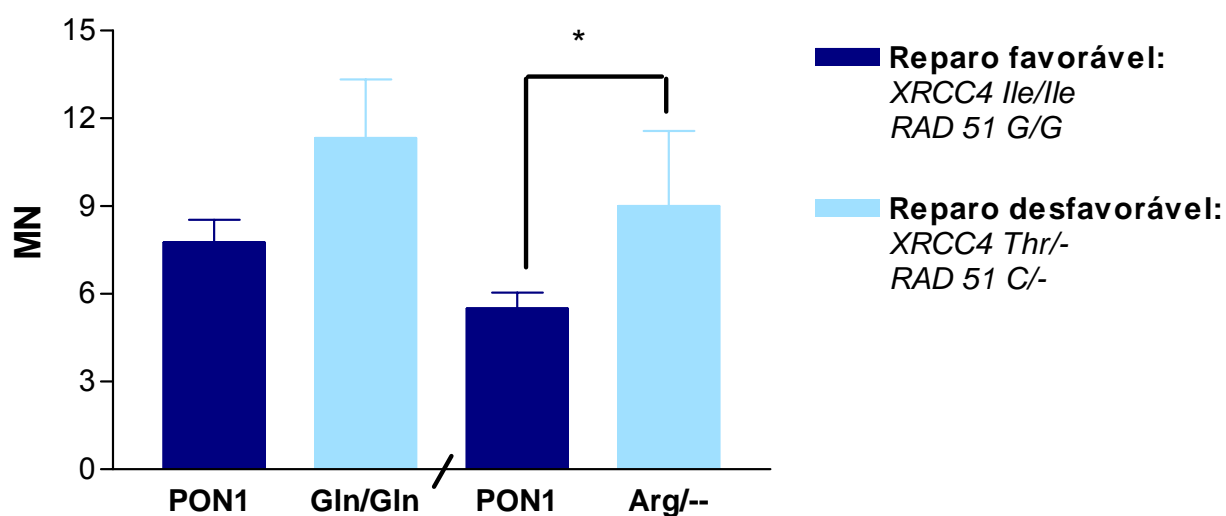
se uma análise da influência destes genótipos conjuntamente, comparando os genótipos de reparo favorável (os três genótipos de reparo com menor número de MN, nas análises anteriores) com os genótipos desfavoráveis (pelo menos um dos genótipos de reparo com maior número de MN, nos grupos de indivíduos com diferentes genótipos *PON1* (Figura 11). Os resultados desta análise não demonstraram diferença estatística, porém pode-se perceber que entre indivíduos com o genótipo *PON1 Gln/Gln*, a presença de um genótipo de reparo favorável leva a menores números de MN.



**Figura 11.** Gráfico com a freqüência de MN nos indivíduos expostos com os diferentes genótipos *PON1* e de reparo, considerando *XPB*, *Rad51* e *XRCC4*.



Considerando que destes genes de reparo, os genes *Rad51* e *XRCC4* fazem parte das vias de reparo de quebras de fita dupla, analisou-se a influência dos polimorfismos destes genes conjuntamente, nas freqüências de MN dos grupos de indivíduos com diferentes genótipos *PON1* (Figura 12). Estes resultados demonstram que independente do genótipo *PON1* o genótipo de reparo favorável é mais eficiente em reparar os danos causados pela exposição a pesticidas, porém apenas entre os indivíduos *PON Arg/* – foi detectada diferença significativa ( $P < 0.05$ )



**Figura 12.** Gráfico com a freqüência de MN nos indivíduos expostos com os diferentes genótipos *PON1* e de reparo, considerando *Rad51* e *XRCC4*. \*  $P < 0,05$ , Teste t-Student.

## 5. DISCUSSÃO

O uso de pesticidas tem aumentando anualmente. Indivíduos expostos a pesticidas apresentam alterações em diferentes biomarcadores como no teste de aberrações cromossômicas, na análise de troca de cromátides irmãs, no teste de MN e no Ensaio Cometa (Shaham *et al.*, 2001, Grover *et al.*, 2003, Saiaja *et al.*, 2006). Muitos fatores são responsáveis pela modulação dos efeitos da exposição a pesticidas, como exemplo destes fatores podemos citar a utilização ou não de equipamentos pessoais de proteção, tempo e condições de exposição, como também variações individuais nos genes de metabolização de xenobióticos e de reparo de DNA, estes conhecidos como biomarcadores de susceptibilidade (Bolognesi, 2003; Bull *et al.*, 2006; Heuser *et al.*, 2007). Silva *et al.* (2008) observaram que apesar de mais de 74% dos indivíduos da amostra de agricultores terem declarado usar equipamentos de proteção individual, foi verificado aumento significativo nos níveis de dano de DNA.

A susceptibilidade a incorporação de mutações já foi associada ao aumento de risco de diferentes tipos de câncer, em diversos estudos de caso-controle (IARC, 1999). Muitos estudos demonstraram a influência dos biomarcadores de susceptibilidade (polimorfismos em genes de metabolização e de reparo de DNA) nos níveis dos biomarcadores de exposição e efeito em populações ocupacionalmente expostas (Pitarque *et al.*, 1999 e 2002; Hernández *et al.*, 2005; Heuser *et al.*, 2007). Os estudos com polimorfismos genéticos têm sido considerados importantes ferramentas que podem tornar as análises de biomonitoramento mais sensíveis na identificação dos efeitos da exposição uma vez que categoriza a amostra em subgrupos mais específicos (Norppa, 1997).

As frequências gênicas e genóticas verificadas neste trabalho são similares às descritas previamente em outras populações (Ford *et al.*, 2000, Shen *et al.*, 2000, Hou *et al.*, 2002, Rossit *et al.*, 2002, Relton *et al.*, 2004, Casson *et al.*, 2005, De Ruyck *et al.*, 2005, Hansen *et al.*, 2005, Hung *et al.*, 2005, Vogel *et al.*, 2005, Webb *et al.*, 2005, Matullo *et al.*, 2006, Voso *et al.*, 2007). Os sistemas *OGG1\*Ser326Cys*, *XRCC1\*Arg194Trp*, *XPD\*Ile199Met* e *XPD\*Asp312Asn* apresentaram-se em Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Os sistemas *Rad51\*G135C* e *XRCC4\*ile401Thr* não estavam em Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Outros trabalhos já demonstraram isso para o polimorfismo do gene *Rad51* estudado (Webb *et al.*, 2005).

A via BER está envolvida com a reparação de pequenas lesões como bases oxidadas ou reduzidas. Os resultados apresentados no presente trabalho quanto ao gene *OGG1* mostraram que indivíduos com o alelo variante (*OGG1\*Cys*) apresentam maiores níveis de ID e FD no Ensaio Cometa do que os indivíduos homocigotos selvagens (*OGG1 Ser/Ser*). Estes resultados estão de acordo com outros estudos que sugerem que o alelo *OGG1 Cys* tenha menor habilidade de suprimir mutações do que o alelo selvagem (*OGG1\*Ser*) e por isso, é considerado um fator de risco para uma variedade de tumores, como câncer de estômago e adenocarcinoma de pulmão (Kohno *et al.*, 1998; Ito *et al.*, 2002; Takezaki *et al.*, 2002, Yamane *et al.*, 2004). O Ensaio Cometa detecta principalmente danos oxidativos, quebras de fita simples e dupla, *crosslinks* DNA-DNA e DNA – proteína, e já foi descrito em diferentes estudos por ser capaz de detectar lesões oxidativas causadas por pesticidas (Garaj-Vrhovac & Zeljezic, 2001; Shaham *et al.*, 2001; Zeljezic & Garaj-Vrhovac, 2001; Grover *et al.*, 2003). Por outro lado nos resultados do teste de MN que detecta

mutagênese cromossômica, como clastogênese e aneugênese, não foram observadas diferenças entre os genótipos *OGG1\*Ser326Cys*. Com isso, nossos resultados indicam que a variação na função da proteína Ogg1 pode influenciar na eficiência de reparo de lesões causadas pela exposição a pesticidas detectadas no teste Cometa, mas não nas lesões cromossômicas detectadas no teste de MN. É interessante poder observar que os indivíduos *OGG1 Ser/Ser* tenham a capacidade de suprir de forma mais eficiente as lesões detectadas pelo Ensaio Cometa, pequenas lesões como bases oxidadas ou reduzidas.

Apesar de nossos dados demonstrarem que os indivíduos com o genótipo *XRCC1 Arg/Arg* tenham aumento nos níveis de dano de DNA comparando com indivíduos com o genótipo *XRCC1 Trp/ -*, sugerindo um efeito protetor do alelo *XRCC1\*Trp*, estas diferenças não foram estatisticamente significantes. Contudo, diversos estudos apresentam tendência similar, o efeito protetor da presença do alelo variante contra tumores (Goode *et al.*, 2002; Stern *et al.*, 2001, Hu *et al.*, 2005; Hung *et al.*, 2005; Breton *et al.*, 2007). A falta de significância estatística, em nosso estudo, pode ser explicada pela baixa frequência do alelo variante em uma amostra limitada. Estudos demonstraram que o ambiente de exposição pode regular negativamente a expressão de diversas proteínas de reparo. Breton *et al.* (2007) sugeriram que esta regulação possa ser alelo específica, sendo o genótipo *XRCC1* selvagem mais fortemente regulado que os genótipos *XRCC1* heterozigoto e homozigoto variante, assim o alelo variante pode ser protetor porque o reparo de DNA pode ser mais fortemente inibido nos indivíduos com o genótipo selvagem.

Nesta mesma amostra já foi previamente demonstrada a influência do polimorfismo *PON1\*Gln192Arg* na frequência de MN, sendo que a presença do alelo *PON1\*Arg*, em homo ou heterozigose, parece ter um papel protetor (Silva *et al.*, 2008). Considerando isto, juntamente com o fato de a susceptibilidade a xenobióticos depender da interação de muitos fatores, incluindo os fatores genéticos como a eficiência de metabolização e de reparo, realizou-se uma análise combinada do genótipo de *PON1* com o genótipo de cada um dos polimorfismos de reparo estudados neste trabalho.

Com os genótipos da via BER esta análise combinada mostrou-nos que independente do genótipo *PON1\*Gln192Arg*, indivíduos *OGG1 Ser/Ser* apresentaram menores níveis de dano de DNA (ID e FD), comparando com indivíduos com o alelo *OGG1* variante. Enquanto que o genótipo de *XRCC1\*Arg194Trp*, mais uma vez, pareceu não influenciar nos biomarcadores de exposição e efeito. Desta forma estes resultados demonstraram que o reparo eficiente na via BER, principalmente no reconhecimento da lesão, etapa da via BER onde a proteína Ogg1 atua, pode compensar os efeitos da baixa eficiência de metabolização.

Em relação à via NER, a qual repara danos que levam a distorções maiores, como dímeros de pirimidinas, grandes aductos e *crosslink* (pontes entre cadeias de DNA), foram estudados dois polimorfismos no gene *XPB*: códons 199 e 312. Para o polimorfismo *XPB\*Ile199Met*, a frequência do alelo polimórfico foi pequena (0,03), impossibilitando a avaliação da sua influência nos níveis dos biomarcadores de exposição e efeito, como já aconteceu em outros grupos estudados (Lunn *et al.*, 2000). O polimorfismo *XPB\*Asp312Asn* que já foi considerado um modulador desta via de reparo em pacientes com

câncer de pulmão (Lopez-Cima *et al.*, 2007), neste trabalho, detectamos influência deste polimorfismo nos níveis dos biomarcadores de exposição, ID e FD, apenas dos indivíduos não expostos. Assim, este polimorfismo parece modular a eficiência de reparo de uma maneira geral, mas não especificamente o reparo dos danos causados pela exposição a pesticidas. Au *et al.* (2003) demonstraram que indivíduos portadores do alelo variante apresentaram reparo menos eficiente para danos induzidos por U.V. e que para danos devido à exposição a raios-X, este alelo não apresentou diferenças na atividade em relação ao alelo selvagem. Estes dados, juntamente com os de nosso trabalho, evidenciam que a modulação no reparo da via NER por este polimorfismo está diretamente ligada a substância causadora do dano, uma vez que, cada substância tem o potencial de gerar diferentes tipos de lesão. Quando analisada esta via de forma combinada ao *PON1*, verifica-se que indivíduos *XPD Asn/-* e *PON Gln/Gln* apresentam uma tendência maior aos danos cromossômicos (MN), assim, os indivíduos com genótipo selvagem parecem ser mais eficientes no reparo.

O polimorfismo do gene envolvido na via de HR, que repara quebras de fita dupla, utilizando uma molécula como molde, *Rad51\*G135C* está localizado na região 5'UTR do gene, podendo afetar a instabilidade do mRNA ou a eficiência de translocação para o citoplasma, bem como levar a alterações nos níveis ou na função da proteína (Poplawski *et al.*, 2006). Nosso estudo não demonstrou influência deste polimorfismo individualmente, ou quando foram considerados separadamente os indivíduos expostos com os diferentes genótipos de *PON1\*Gln192Arg*, nos níveis de dano em nossa amostra. Porém, é bom salientar que na análise combinada, nos dois grupos com diferentes

genótipos de *PON1*, os indivíduos com o genótipo *Rad51 G/G* apresentaram menores frequências de MN, mas sem significância estatística, o que possivelmente pode ser explicado pela baixa frequência do alelo variante, juntamente com o número amostral pequeno e limitado. Outros estudos já associaram este polimorfismo com aumento no risco de carcinoma de bexiga, Leucemia Mielóide Aguda (LMA) e câncer gástrico (Matullo *et al.*, 2001, Seedhouse *et al.*, 2004, Poplawski *et al.*, 2006). A análise da influência do polimorfismo *PON1\* Gln192Arg*, nos grupos de indivíduos com diferentes genótipos *Rad51\*G135C*, demonstrou mais uma vez a influência do polimorfismo de metabolização *PON1\* Gln192Arg*, independentemente do genótipo de reparo *Rad51\*G135C*, apesar de entre os indivíduos com o genótipo *Rad51 C/* – não haver diferença estatisticamente significativa, provavelmente devido à baixa frequência do alelo variante de *Rad51*. Estas análises demonstram a importância do genótipo *PON1\* Gln192Arg* na resposta a exposição a pesticidas.

A via de NHEJ é importante no reparo de quebras de fita dupla, fazendo a ligação de extremidades quebradas (Goode *et al.*, 2002; Costa & Menck, 2004). O polimorfismo desta via estudado neste trabalho foi o *XRCC4\*Ile401Thr*. Este polimorfismo não tem muitos estudos em relação à alteração na função protéica que ele pode causar (Relton *et al.*, 2004). Entre os indivíduos expostos, os indivíduos que apresentaram o alelo *XRCC4\*Thr* tiveram maior frequência de MN ( $P=0,024$ ), indicando uma menor atividade do alelo variante (*Thr*). Este parece ser o modulador do efeito de incorporação de danos maiores devido à exposição a agrotóxicos. A mesma tendência de proteção do alelo nos indivíduos com o alelo *XRCC4* selvagem foi observada

na análise dos grupos de indivíduos expostos com diferentes genótipos *PON1\*Gln192Arg*, mas sem significância estatística. A falta de significância encontrada na análise da influência do polimorfismo pode ser explicada pelo pequeno número amostral, juntamente com a baixa frequência do alelo variante em nossa amostra. Ao separar os indivíduos expostos conforme o genótipo *XRCC4\*Ile401Thr*, verifica-se que a presença do alelo *PON1\*Arg* parece ser um fator de proteção, mas a diferença estatística só foi verificada no grupo com o genótipo *XRCC4 Ile/Ile*, o que pode ser justificada pelo pequeno número de indivíduos no grupo com genótipo *XRCC4 Thr/-*. Novamente pode-se verificar que indivíduos *PON Gln/Gln* (maior frequência de micronúcleos) com deficiência de reparo de dupla quebra (*XRCC4 Thr/-*) apresentam um maior valor de células micronucleadas.

Nossos resultados ao agrupar genótipos de reparo favoráveis *versus* desfavoráveis nos diferentes genótipos de *PON1Gln192Arg*, demonstram que o fato de o indivíduo exposto a pesticidas ter um reparo não eficiente, principalmente o reparo de quebra de fita dupla, é mais preocupante quando acompanhado de um genótipo de metabolização que geram maiores níveis de danos (*PON1Gln/Gln*), pois estes danos são reparados com menor eficiência e, por isso, acabam sendo acumulados.

Assim, os resultados demonstram que os danos detectados pelo Ensaio Cometa, principalmente danos oxidativos, quebras de fita simples e dupla, *crosslinks* DNA-DNA e DNA-proteína, são reparados preferencialmente pela via BER, que é descrita como responsável pela reparação de pequenas lesões como bases oxidadas ou reduzidas. Enquanto que no reparo dos danos



detectados no Teste de MN, clastogênese e aneugênese, são as vias HR e NHEJ que atuam no reparo de quebras de fita dupla, como também a via NER.

Outro ponto que nossos resultados evidenciam, é a importância de considerar a suscetibilidade genética individual em incorporar danos no DNA, considerando as variações nas proteínas de metabolização/detoxificação e de reparo, tanto separadamente como combinados, já que estes processos atuam coordenadamente para uma resposta final a exposição a xenobióticos e, por isso, podem compensar os efeitos um do outro.

## 6. CONCLUSÕES

### 6.1. Conclusões gerais

Este trabalho nos permitiu concluir que as vias BER, HR, NHEJ estão envolvidas no reparo dos danos causados pela exposição a pesticidas, e que seus efeitos podem estar relacionados com a eficiência de metabolização destas substâncias.

### 6.2. Conclusões específicas

- O alelo *OGG1 Ser* protegeu seus portadores dos danos detectados no Ensaio Cometa, tanto na análise individual quanto quando combinados com o polimorfismo *PON1\*Gln192Arg*.
- O polimorfismo *XRCC1\*Arg194Trp* apresentou uma tendência de proteção do alelo *XRCC1 Trp* para os biomarcadores de exposição e efeito.
- O polimorfismo *XPB\*Asp312Asn*, na análise individual, parecem modular os danos detectados no Ensaio Cometa, para exposição de uma maneira geral, ou seja, nos indivíduos não expostos a pesticidas, mas que possuem exposição não específica. Na análise combinada com o polimorfismo *PON1\*Gln192Arg*, entre os indivíduos expostos, o genótipo *XPB Asp/Asp* tende a redução do número de MN.
- O polimorfismo *Rad51\*G135C*, individualmente parece não influenciar os biomarcadores analisados. Na análise combinada com o polimorfismo *PON1\*Gln192Arg*, o alelo *Rad51 G*, demonstrou uma tendência de proteção nos níveis de MN.

- Na análise individual, o genótipo *XRCC4 Ile/Ile* apresentou menores números de MN. Na análise combinada, este polimorfismo não influenciou os biomarcadores.
- Ao combinar, nos indivíduos expostos, os polimorfismos de reparo que influenciaram, ou pareceram influenciar nos números de MN (*XPB*, *Rad51*, *XRCC4*), como genótipos favoráveis ou desfavoráveis, o grupo com reparo favorável demonstrou uma tendência de proteção nos números de MN.
- Combinando apenas os polimorfismos de genes que participam do reparo de quebra de fita dupla, *Rad51* e *XRCC4*, o reparo favorável apresentou-se mais eficiente no reparo de danos detectados no teste de MN, principalmente entre os indivíduos *PON Arg/–*.

## 7. PERSPECTIVAS

Com este trabalho, foi possível uma melhor compreensão dos efeitos da suscetibilidade genética nos biomarcadores de exposição e efeito, em indivíduos expostos a pesticidas. Assim, apontamos como perspectivas para este estudo:

- Aumentar a amostra de viticultores,
- Analisar outros polimorfismos de reparo nos genes já analisados, como também em outros,
- Realizar a análise combinada com os demais polimorfismos em genes de metabolização já estudados.
- Analisar a influência destes polimorfismos nos dados de estresse oxidativo detectados pela inibição da enzima colinesterase, pela peroxidação lipídica e pela atividade do superóxido dismutase;
- Analisar estes polimorfismos em grupos com exposição a outras substâncias.

## 8. REFERÊNCIAS

- Alves A (1986) Usos e Abusos. *Ciência Hoje* 4: 49-52.
- Amorim LCA (2003) O Uso dos Biomarcadores na Avaliação da Exposição Ocupacional a Substâncias Químicas. *Rev Bras Med Trab* 1: 124-132.
- Araújo C & Queiroz A. – Neuropatias por Organofosforados. On-line. Disponível em <http://www://.medstudents.com.br> consultado em 20/09/2006.
- Arcury TA, Quandt SA, Mellen BG (2003) An exploratory analysis of occupational skin disease among Latino migrant and seasonal farm workers in North Carolina. *J Agric Saf Health* 9: 221–32.
- Au WW, Salama SA, Sierra-Torres CH (2003) Functional characterization of polymorphisms in DNA repair genes using cytogenetic challenge assay. *Environ Health Perspect* 111: 1843-1850.
- Bonassi S & Au WW (2002) Biomarkers in molecular epidemiology studies for health risk prediction. *Mutat Res* 511: 73–86.
- Breton CV, Zhou W, Kile ML (2007) Susceptibility to arsenic-induced skin lesions from polymorphisms in base excision repair genes. *Carcinogenesis* 28: 1520 – 1525.
- Carrano AV & Natarajan AT (1988) Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques, International Commission for Protection against Environmental Mutagens and Carcinogens (ICPEMC publication 14). *Mutat Res* 204: 379-406.
- Casson AG, Zhen Z, Evans SC, Veugelers PJ, Porter GA, Guernsey DL (2005) Polymorphisms in DNA repair genes in the molecular pathogenesis of esophageal (Barrett) adenocarcinoma. *Carcinogenesis*. 26: 1536-1541.
- Cebulska-Wasilewska A (2003) Response to challenging dose of X-rays as a predictive assay for molecular epidemiology. *Mutat Res* 544: 289–297.
- Costa RM & Menck CF (2004) Genes de Reparo de DNA In: Ferreira CG & Rocha J C (Organizadores). *Oncologia Molecular*. Ed. Atheneu. São Paulo, pp 43-55.
- Crinnion WJ (2000) Environmental medicine, part 4: pesticides - biologically persistent and ubiquitous toxins. *Altern Med Rev* 5: 432-447.
- Daniels JL, Olshan AF, Savitz DA (1997) Pesticides and childhood cancers. *Environ Health Perspect* 105: 1068–1077.
- Das R, Steege A, Baron S, Beckman J, Harrison R (2001) Pesticide-related illness among migrant farm workers in the United States. *Int J Occup Environ Health* 7: 303–312.
- De Celis R, Pedron-Nuevo N, Gonzalez-Unzaga M, Fugarolas-Marin J, Ferial-Velasco A (2005) Increased frequency of micronuclei in immature seminal

- germinal cells of male workers exposed to aromatic hydrocarbons. *Fertil Steril*. 84: 808-810.
- De Ruyck K, Van Eijkeren M, Claes K, Morthier R, De Paepe A, Vral A, De Ridder L, Thierens H (2005) Radiation-induced damage to normal tissues after radiotherapy in patients treated for gynecologic tumors: association with single nucleotide polymorphisms in XRCC1, XRCC3, and OGG1 genes and in vitro chromosomal radiosensitivity in lymphocytes. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 62: 1140-1149.
- Ecobichon DJ (1996) Toxic effects of pesticides. In: Casarett and Doull's *Toxicology: The Basic Science of Poisons* (Klaassen CD, Doull J, eds). 5th ed. MacMillan, New York. pp 643–689.
- Efferth T & Volm M (2005) Pharmacogenetics for individualized cancer chemotherapy. *Pharmacol Ther* 107: 155–176.
- Engel LS, O'Meara ES, Schwartz SM (2000) Maternal occupation in agriculture and risk of limb defects in Washington State, 1980-1993. *Scand J Work Environ Health* 26: 193–198.
- Eskenazi B, Bradman A, Castorina R (1999) Exposures of children to organophosphate pesticides and their potential adverse health effects. *Environ Health Perspect* 107:409–419.
- Falk G, Hirvonen A, Scarpato R, Saarikoski ST, Migliore L, Norppa H (1999) Micronuclei in blood lymphocytes and genetic polymorphisms for GSTM1, GSTT1 and NAT2 in pesticide-exposed greenhouse workers. *Mutat Res* 44: 225-237.
- Fenech, M, Titenko-Holland, N, Chang, WP, Zeiger, E, Bonassi, S (1999) The Human Micronucleus Project – An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutat Res* 428: 271-283.
- Ferrer A (2003) Pesticide poisoning. *An Sist Sanit Navar - Suppl* 1: 155-171.
- Firestone JA, Smith-Weller T, Franklin G, Swanson P, Longsteth WT, Checkoway H. (2005) Pesticides and risk of Parkinson disease: a population-based case-control study. *Arch Neurol* 62(1):91–95.
- Ford BN, Ruttan CC, Kyle VL, Brackley ME, Glickman BW (2000) Identification of single nucleotide polymorphisms in human DNA repair genes. *Carcinogenesis* 21:1977-1981.
- Fritschi L, Benke G, Hughes AM, Kricker A, Turner J, Vajdic CM, Grulich A, Milliken S, Kaldor J, Armstrong BK (2005) Occupational Exposure to Pesticides and Risk of Non-Hodgkin's Lymphoma. *Am J Epidemiol* 162: 849-857.
- Gao WM, Romkes M, Day R, Siegfried JM, Luketich JD, Mady HH, Melhem MF, Keohavong P (2003) Association of the DNA repair gene *XPD* Asp312Asn polymorphism with p53 mutations in tobacco-related non-small cell lung cancer. *Carcinogenesis* 24: 1671-1676.

- Garaj-Vrhovac V & Zeljezic D (2001) Cytogenetic monitoring of croatian population occupationally exposed to a complex mixture of pesticides. *Toxicology* 165:153-62.
- Garcia AM (2003) Pesticide exposure and women's health. *Am J Ind Med* 44:584–594.
- Goode EL, Ulrich CM, Potter JD (2002) Polymorphisms in DNA Repair Genes and Associations with Cancer Risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11: 1513–1530.
- Grover P, Danadevi K, Mahboob M, Rozati R, Banu BS, Rahman MF. (2003) Evaluation of genetic damage in workers employed in pesticide production utilizing the Comet assay. *Mutagenesis* 18: 201-205.
- Guecheva TN & Henriques JAP (2003) Metabolismo de Xenobióticos: Citocromo P450. In: Silva J, Erdtmann B, Henriques JPA (organizadores) *Genética Toxicológica*. Ed. Alcance. Porto Alegre, pp 225-247.
- Hansen R, Saebo M, Skjelbred CF, Nexø BA, Hagen PC, Bock G, Bowitz Lothe IM, Johnson E, Aase S, Hasteen IL, Vogel U, Kure E H (2005) GPX Pro198Leu and OGG1 Ser326Cys polymorphisms and risk of development of colorectal adenomas and colorectal cancer. *Cancer Lett.* 229: 85-91.
- Hao B, Wang H, Zhou K, Li Y, Chen X, Zhou G, Zhu Y, Miao X, Tan W, Wei Q, Lin D, He F (2004) Identification of genetic variants in base excision repair pathway and their associations with risk of esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 64:4378-4384.
- Heuser, VD, Erdtmann B, Kvitko K, Rohr P, Silva J (2007) Evaluation of genetic damage in Brazilian footwear-workers: Biomarkers of exposure, effect, and susceptibility. *Toxicology* 232: 235–247.
- Hou S-M, Falt S, Angelini S, Yang K, Nyberg F, Lambert B, Hemminki K (2002) The XPD variant alleles are associated with increased aromatic DNA adduct level and lung cancer. *Carcinogenesis* 23: 599-603.
- Hoyos LS, Carvajal S, Lolano L, Rodriguez J, Orozco L, López Y, Au WW (1996) Cytogenetic monitoring of farmers exposed to pesticides in Colombia. *Environ Health Perspect* 104: 535-538.
- Hu, Z, Ma, H, Chen, F, Wei, Q, Shen, H (2005) XRCC1 polymorphisms and cancer risk: a meta-analysis of 38 case-control studies. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 14: 1810 - 1818.
- Humbert R, Adler DA, Distèche CM, Hasset C, Omiencinski CJ, Furlong CE. He (1993) molecular basis of human serum paraoxonase activity polymorphism. *Nat Genet* 3: 73-76.
- Hung RJ, Brennan P, Boffetta P (2005) Genetic Polymorphisms in the Base Excision Repair Pathway and Cancer Risk: A HuGE Review. *Am J Epidemiol.* 162:925-42.

- Ito H, Hamajima N, Takezaki T, Matsuo K, Tajima K, Hatooka S, Mitsudomi T, Suyama M, Sato S, Ueda R (2002) A limited association of OGG1 Ser326Cys polymorphisms for adenocarcinoma for the lung. *J Epidemiol* 12: 258-265.
- Jawad M, Seedhouse C, Russell N, Plumb M (2006) Polymorphisms in human homeobox HLX1 and DNA repair RAD51 genes increase the risk of therapy-related acute myeloid leukemia. *Blood* 108: 3916-3918.
- Kauffer E & Vincent R (2006) Occupational Exposure to Mineral Fibres: Analysis of Results Stored on Colchic Database. *Ann Occup Hyg* 51: 131-142.
- Keshava N & Ong T (1999) Occupational exposure to genotoxic agents. *Mutat Res* 437: 175–194.
- Kohno T, Shinmura K, Tosaka M, Tani M, Kim Sr., Sugimura H, Nohmi T, Kasai H, Yokota J (1998) Genetic polymorphisms and alternative splicing of the hOGG1 gene, that is involved in the repair of 8-hydroxyguanine in damaged DNA. *Oncogene* 16: 3219-3225.
- Kowalski LD, Mutch DG, Herzog TJ, Rader JS, Goodfellow PJ (1997) Mutational Analysis of MLH1 and MSH2 in 25 Prospectively-Acquired RER1 Endometrial Cancers. *Genes Chromosomes Cancer* 18: 219–227.
- Langenbach T (1989) Pesticidas: Tecnologia sofisticada em mãos desinformadas. *Ciência Hoje* 10: 66-68.
- Lee K-M, Choi J-Y, Kang C, Kang CP, Park SK, Cho H, Cho D-Y, Yoo K-Y, Noh D-Y, Ahn S-H, Park C-G, Wei Q, Kang D (2005) Genetic Polymorphisms of Selected DNA Repair Genes, Estrogen and Progesterone Receptor Status, and Breast Cancer Risk. *Clin Cancer Res* 11: 4620-4626.
- Lowry LK (1995) Role of biomarkers of exposure in the assessment of health risk. *Toxicol Lett* 124: 71-81.
- Lucas D, Ferrara R, Gonzáles E, Albores A, Manno M, Berthou F (2001) Cytochrome CYP2E1 phenotyping and genotyping in the evaluation of health risks from exposure to polluted environments. *Toxicol Lett* 124: 71–81.
- Lunn RM, Langlois RG, Hsieh LL, Thompson CL, Bell DA (1999) XRCC1 polymorphisms: effects on aflatoxin B1-DNA adducts and glycophorin A variant frequency. *Cancer Res* 59: 2557–2561.
- Lunn RM, Helzlsouer KJ., Parshad R, Umbach DM, Harris EL, Sanford KK, Bell DA (2000) XPD polymorphisms: effects on DNA repair proficiency. *Carcinogenesis*. 4:551-555.
- Maluf SW & Erdtmann B (2003) Biomonitorização do Dano Genético em Humanos. In: Silva J, Erdtmann B, Henriques JPA (organizadores) *Genética Toxicológica*. Ed. Alcance. Porto Alegre pp 183-205.



- Maroni M, Calosio C, Ferioli A, Fait A (2000) Biological Monitoring of Pesticide Exposure: a review. *Introduction. Toxicology* 143:1-118.
- Marsin S, Vidal AE, Sossou M, Menissier-de Murcia J, Le Page F, Boiteux S, de Murcia G, Radicella JP (2003) Role of XRCC1 in the coordination and stimulation of oxidative DNA damage repair initiated by the DNA glycosylase hOGG1. *J Biol Chem* 278: 44068–44074.
- Matullo G, Guarrera S, Carturan S, Peluso M, Malaveille C, Davico L, Piazza A, Vineis P. (2001) DNA repair gene polymorphisms, bulky DNA adducts in white blood cells and bladder cancer in a case-control study. *Int J Cancer*: 92: 562–567.
- Matullo G, Berwick M, Vineis P (2005) Gene – Environment Interactions: How Many False Positives? *J Natl Cancer Inst* 97:550-551.
- Muniz JF, McCauley L, Scherer J, Lasarev M, Koshy M, Kow YW, Nazar-Stewart V, Kisby GE (2008) Biomarkers of oxidative stress and DNA damage in agricultural workers: A pilot study. *Toxicol Appl Pharmacol* 227: 97–107.
- Naccarati A, Soucek P, Steline R, Haufroid V, Kumar R, Vadickova L, Trtkova K, Dusinska M, Hemminki K, Vodicka P (2005) Genetic polymorphisms and possible gene-gene interactions in metabolic and DNA repair genes: effects on DNA damage. *Mutat Res* 593:22-31.
- National Occupational Research Agenda Team (2003) Priorities for development of research in occupational cancer. *Environ Health Perspect* 111: 1-12.
- Norppa H (2001) Genetic polymorphisms and chromosome damage. *Int J Hyg Environ Health* 204: 31-38.
- O'Malley MA (1997) Skin reactions to pesticides. *Occup Med* 12:327–345.
- Omenn GS (1991) Future research directions in cancer ecogenetics. *Mutat Res* 247: 283-291.
- Pastor S, Creus A, Parron T, Cebulska-Wasilewska A, Siffel C, Piperakis S, Marcos R (2003) Biomonitoring of four European populations occupationally exposed to pesticides: use of micronuclei as biomarkers. *Mutagenesis*. 18:249-58.
- Pivetta F, Machado JMH, Araújo UC, Moreira MFR, Apostoli P (2001) Monitoramento biológico: conceitos e aplicações em saúde pública. *Cad Saúde Pública*, 17: 545-554.
- Poplawski T, Arabski M, Kozirowska D, Blasinska-Morawiec M, Morawiec Z, Morawiec-Bajda A, Klupińska G, Jeziorski A, Chojnacki J, Blasiak J (2006) DNA damage and repair in gastric cancer—A correlation with the hOGG1 and RAD51 genes polymorphisms. *Mutat Res* 601: 83-91.
- Relton CL, Daniel CP, Hammal DM, Parker L, Tawn EJ, Burn J (2004) DNA repair gene polymorphisms, pre-natal factors and the frequency of somatic

- mutations in the glycoporphin-A gene among healthy newborns. *Mutat Res* 545:49-57.
- Richiardi L, Mirabelli D, Calisti R, Ottino A, Ferrando A, Boffetta P, Merletti F (2006) Occupational exposure to diesel exhausts and risk for lung cancer in a population-based case-control study in Italy. *Ann Oncol* 17: 1842-1847.
- Rossit AR, Cabral IR, Hackel C, Da Silva R, Froes ND, Abdel-Rahman SZ (2002) Polymorphisms in the DNA repair gene XRCC1 and susceptibility to alcoholic liver cirrhosis in older Southeastern Brazilians. *Cancer Lett.* 180:173-82.
- Saffi J & Henriques JAP (2003) Reparação de DNA em células Eucarióticas. In: Silva J, Erdtmann B, Henriques JPA (organizadores) *Genética Toxicológica*. Ed. Alcance. Porto Alegre pp 271-305.
- San Filippo J, Sung P, Klein H (2008) Mechanism of Eukaryotic Homologous Recombination. *Annu Rev Biochem* 77: 229-257.
- Sauviat MP & Pages N (2002) Cardiotoxicity of lindane a gamma isomer of hexachlorocyclohexane. *J Soc Biol* 196:339-348.
- Seedhouse C, Faulkner R, Ashraf N, Das-Gupta E, Russell N (2004) Polymorphisms in genes involved in homologous recombination repair interact to increase the risk of developing acute myeloid leukaemia. *Clin Cancer Res* 10: 2675–2680.
- Shaham J, Kaufman Z, Gurvich R, Levi Z (2001) Frequency of sister-chromatid exchange among greenhouse farmers exposed to pesticides. *Mutat Res* 491:71-80.
- Shen H, Xu Y, Qian Y, Yu R, Qin Y, Zhou L, Wang X, Spitz MR, Wei Q (2000) Polymorphisms of the DNA repair gene XRCC1 and risk of gastric cancer in a Chinese population. *Int J Cancer* 88: 601-606.
- Siemiatycki J, Richardson L, Straif K, Latreille B, Lakhani R, Cambell S, Rousseau MC, Boffeta P (2004) Listing occupational carcinogens. *Environ Health Perspect* 112:1447-1459.
- Silva J, Moraes CR, Heuser VD, Andrade V, Silva FR, Kvitko K, Emmel V, Rohr P, Salvador M, Bordin DL, Andrezza AC, Henriques JAP, Erdtmann B (2008) Evaluation of Genetic Damage in Brazilian Population Occupationally Exposed to Pesticides and Correlation with Polymorphisms in Metabolizing Genes. *Mutagenesis (in press)*
- Singh, NP, McCoy, MT, Tice, RR, Schneider, EL (1988). A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res* 175: 184-191.
- Spitz MR, Wu X, Wang Y, Wang LE, Shete S, Amos CI, Guo Z, Lei L, Mohrenweiser H, Wei Q (2001) Modulation of nucleotide excision repair capacity by XPD polymorphisms in lung cancer patients. *Cancer Res* 61: 1354–1357.

- Stallones L & Beseler C (2002) Pesticide illness, farm practices, and neurological symptoms among farm residents in Colorado. *Environ Res* 90:89–97.
- Stern MC, Umbach DM, van Gils CH, Lunn RM, Taylor JA (2001). DNA Repair Gene XRCC1 Polymorphisms, Smoking, and Bladder Cancer Risk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 10: 125–131.
- Strong LL, Thompson B, Coronado GD, Griffith WC, Vigoren EM, Islas I (2004) Health symptoms and exposure to organophosphate pesticides in farmworkers. *Am J Ind Med* 46:599–606.
- Suntres ZE (2002) Role of antioxidants in paraquat toxicity. *Toxicology.* 180:65-67.
- Takezaki T, Gao CM, Wu JZ, Li ZY, Wang JD, Ding JH, Liu YT, Hu X, Xu TL, Tajima KI, Sugimura H (2002) hOGG1 Ser(326)Cys polymorphism and modification by environmental factors of stomach cancer risk in Chinese. *Int J Cancer* 99: 624-627.
- Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF (2000) Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. *Environ Mol Mutagen* 35: 206-221.
- van Hoffen A, Balajee AS, van Zeeland AA, Mullenders LHF (2003) Nucleotide excision repair and its interplay with transcription. *Toxicology* 193: 79–90.
- Van Maele-Fabry G & Willems JL (2003) Occupation related pesticide exposure and cancer of the prostate: a meta-analysis. *Occup Environ Med* 60(9):634–642.
- Villela IV, Lau A, Silveira J, Pra D, Rolla HC, Silveira JD (2003). Bioensaios para o Monitoramento de Genotoxicidade Ambiental. In: Silva J., Erdtmann B., Henriques J. P. A. (organizadores) *Genética Toxicológica*. Ed. Alcance. Porto Alegre pp 147-163.
- Vogel U, Overvad K, Wallin H, Tionneland A, Nexø BA, Raaschou-Nielsen O (2005) Combinations of polymorphisms in XPD, XPC and XPA in relation to risk of lung cancer. *Cancer Lett.* 222:67-74.
- Voso MT, Fabiani E, D'Alo'F, Guidi F, Di Ruscio A, Sica S, Pagano L, Greco M, Hohaus S, Leone G (2007) Increased risk of acute myeloid leukaemia due to polymorphisms in detoxification and DNA repair enzymes. *Ann Oncol* 18: 1523–1528.
- Wang WW, Spurdle AB, Kolachana P, Bove B, Modan B, Ebbers SM, Suthers G, Tucker MA, Kaufman DJ, Doody MM, Tarone RE, Daly M, Levavi H, Pierce H, Chetrit A, Yechezkel GH, Chenevix-Trench G, Offit K, Godwin AK, Struwing JP (2001). A single nucleotide polymorphism in the 5' untranslated region of RAD51 and risk of cancer among BRCA1/2 mutation carriers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 10:955-960.

- Wang Y, Spitz M. R., Zhu Y., Dong Q., Shete S., Wu X (2003). From genotype to phenotype: correlating XRCC1 polymorphisms with mutagen sensitivity. *DNA Repair* 2: 901–908.
- Webb PM, Hopper JL, Newman B, Chen X, Kelemen L, Giles GG, Southey MC, Chenevix-Trench G, Spurdle AB (2005) Double-Strand Break Repair Gene Polymorphisms and Risk of Breast or Ovarian Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*: 14: 319-323.
- Wilkinson J & Clapper ML (1997) Detoxification enzymes and chemoprevention. *Proc Soc Exp Biol Med* 216: 192-200.
- World Health Organization. Environmental Health Criteria 222: Biomarkers in risk assessment: Validity and validation. International Program on Chemical Safety (IPCS). Geneva. On-line: <http://www.ichem.org/documents/ehc/ehc/ehc222.html>. 2001.
- Yamane, A, Kohno, T, Ito, K, Sunaga, N, Aoki, K, Yoshimura, K, Murakami, H, Nojima, Y, Yokota J (2004) Differential ability of polymorphic OGG1 proteins to suppress mutagenesis induced by 8-hydroxyguanine in human cell in vivo. *Carcinogenesis* 25: 1689 – 1694.
- Zeljezic D & Garaj-Vrhovac V (2001) Chromosomal aberration and single cell gel electrophoresis (Comet) assay in the longitudinal risk assessment of occupational exposure to pesticides. *Mutagenesis* 16:359-63.

## **9. ANEXOS**

### **9.1. TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO**

#### **1. Dados de Identificação do Projeto de Pesquisa**

- 1.1. Título: Análises químico-clínicas em produtores rurais da região Nordeste do Estado do Rio Grande do Sul: correlação entre o uso de agrotóxicos, inibição da acetilcolinesterase sérica e estresse oxidativo
- 1.2. Unidade executora: Instituto de Biotecnologia/Universidade de Caxias do Sul
- 1.3. Coordenação: Profa. Dra. Mirian Salvador
- 1.4. Endereço para contato: Instituto de Biotecnologia/Universidade de Caxias do Sul. Rua Francisco Getúlio Vargas, 1130. CEP 95079-560 Fone/Fax: (54) 218 22 93. E-mail: [msalvado@ucs.tche.br](mailto:msalvado@ucs.tche.br)
- 1.5. Objetivos do projeto: avaliar o nível de exposição de produtores rurais da região Nordeste do Estado a pesticidas organofosforados e carbamatos

#### **2. Informações ao voluntário**

- 2.1. Participação no projeto: o voluntário participará deste projeto através da doação de sangue para realização de análises bioquímicas. Além disso, deverá submeter-se à exame clínico realizado por médico habilitado e responder à questionário específico (cópia em anexo)
- 2.2. Duração da atividade: aproximadamente 30 minutos
- 2.3. Riscos e desconfortos: não há riscos para o voluntário participante do projeto. O desconforto previsto resume-se à retirada de uma amostra de aproximadamente 10 ml de sangue venoso do braço direito ou esquerdo.
- 2.4. Benefícios esperados: os resultados do exame clínico e laboratorial serão comunicados ao voluntário que ficará ciente da presença ou não de resíduos de agrotóxicos no organismo. Será dada orientação a respeito dos riscos inerentes ao uso de pesticidas e a necessidade da utilização dos equipamentos de segurança.
- 2.5. Critérios de confidencialidade, privacidade e anonimato: todas as análises bioquímicas serão realizadas de forma confidencial, não sendo identificado o voluntário. Os resultados serão informados diretamente ao voluntário pela coordenação do projeto. As publicações não incluirão

qualquer referência ao nome do doador ou outros dados que possam identificá-lo.

- 2.6. Destino do material biológico coletado: após a realização das análises químicas e bioquímicas as amostras de sangue serão descartadas, não podendo ser utilizadas para outros fins.
- 

### **3. Consentimento do voluntário**

Eu, ....., após ler este documento e uma vez esclarecida a minha participação no projeto de pesquisa aqui referido, concordo em:

- a- submeter-me ao exame clínico realizado por médico habilitado;
- b- responder adequadamente ao questionário em anexo;
- c- doar uma amostra de sangue venoso, coletada por farmacêutico habilitado com material totalmente descartável, a qual será utilizada para realização de análises químicas e bioquímicas com o objetivo de avaliar o nível de intoxicação por pesticidas organofosforados e carbamatos.

Assinatura do voluntário:

Assinatura do coordenador do projeto:

Local e data:

## 9.2. QUESTIONÁRIO PESSOAL

1. Idade: \_\_\_\_\_ em anos
2. Data de nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_
3. Sexo: ( )M ( )F
4. Grupo Étnico: ( ) negro; ( ) chinês; ( ) japonês; ( ) outros orientais; ( ) indígena; ( ) latino-americano; ( ) europeu; ( ) asiático
5. Estado civil:
6. N. de filhos:
7. Emprego anterior:
8. Função que exercia:
9. No seu emprego anterior já se expôs a algumas destas substâncias? ( informe tempo de exposição): ( ) derivados do petróleo \_\_\_\_\_ ; ( ) tintas/corantes \_\_\_\_\_ ; ( ) solventes \_\_\_\_\_ ; ( ) pesticidas/herbicidas \_\_\_\_\_ ; ( ) mercúrio/vapores de outros metais pesados – quais? \_\_\_\_\_ ; ( ) outras substâncias químicas – quais? \_\_\_\_\_
10. Função atual:
11. Tempo de serviço:
12. No seu emprego atual já se expôs a algumas destas substâncias? ( informe tempo de exposição):  
( ) derivados do petróleo \_\_\_\_\_ ; ( ) tintas/corantes \_\_\_\_\_ ; ( ) solventes \_\_\_\_\_ ; ( ) pesticidas/herbicidas \_\_\_\_\_ ; ( ) mercúrio/vapores de outros metais pesados – quais? \_\_\_\_\_ ; ( ) outras substâncias químicas – quais? \_\_\_\_\_
13. Tipos de pesticidas que trabalha: ( ) carbamatos; ( ) organofosforados; ( ) piretróides;  
( ) organoclorados
14. De que forma é aplicado? ( ) trator; ( ) bomba manual; ( ) avião; ( ) outros – Quais: \_\_\_\_\_
15. Meses do ano que é aplicado (todos):
16. Mês(es) que é mais aplicado:

17. Periodicidade (todos os dias?):
18. Utiliza equipamento de segurança: ( ) sim ( ) não
19. Quando foi a última vez que foi aplicado?
20. Você come enquanto aplica ou logo após aplicar o agrotóxico? ( ) sim ( ) não
21. Se sim, Lava as mãos antes de pegar nos alimentos? ( ) sim ( ) não
22. Já fumou? ( ) sim ( ) não – se não vá para 26
23. Quantos anos?
24. Ainda fuma? ( ) sim ( ) não – se não há quantos anos parou?
25. Se sim, quantos cigarros por dia? ( ) menos de meio maço; ( ) de meio a um maço; ( ) 1-2 maços; ( ) mais de 2 maços
26. Fuma também: ( ) cigarros de palha ( ) cachimbo – quantas vezes ao dia:  
\_\_\_\_\_
27. Medicamentos utilizados rotineiramente / indicar a freqüência: ( )  
vitaminas e suplementos; ( ) pílulas para pressão; ( ) antibióticos; ( )  
insulina; tranqüilizantes; ( ) relaxantes musculares; ( ) outros:  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_
28. Está fazendo algum tratamento? ( ) sim ( ) não – Qual?
29. Consume bebidas alcoólicas? ( ) sim ( ) não – Qual? Freqüência:
30. Ingere frutas e verduras? ( ) sim ( ) não – Qual? Freqüência:
31. Ingere carnes (não só vermelha)? ( ) sim ( ) não – Qual? Freqüência:
32. Preferência das carnes: ( ) crua; ( ) mal passada; ( ) bem passada / ( )  
gorda; ( ) magra
33. Doenças já contraídas: ( ) câncer; ( ) aids; ( ) diabete; ( ) anemia; ( )  
doenças cardíacas; ( ) outras -  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_
34. Tem conhecimento de algum defeito de nascimento ou doença hereditária que afetem seus pais, irmãos, irmãs ou cônjuges? ( ) sim ( ) não -  
\_\_\_\_\_
35. Você e cônjuge já tiveram dificuldades em conceber (mais de doze meses) ou já foram diagnosticados como estéreis? ( ) sim ( ) não -  
\_\_\_\_\_



36. Histórico de aborto espontâneo? ( ) sim ( ) não -

\_\_\_\_\_

37. Histórico de bebês com defeitos? ( ) sim ( ) não -

\_\_\_\_\_

38. Possui irmão gêmeo idêntico? ( ) sim ( ) não

39. Casos de câncer na família: ( ) sim ( ) não – grau de parentesco -

\_\_\_\_\_

40. Tipos de cânceres: ( ) pele; ( ) mama; ( ) leucemia; ( ) esôfago; ( ) outros

- \_\_\_\_\_

### 9.3. Tabela extraída do artigo Silva *et al.* (2008).

Efeito dos genótipos individuais nos níveis dos diferentes biomarcadores analisados nos grupos não expostos e expostos (média  $\pm$  D.P.).

Genótipos	Ensaio Cometa (100 leucócitos/indivíduo )		Frequência de MN (2000 céls/indiv)(n)
	Índice de dano (n)	Frequência de dano (n)	
Não expostos			
<i>GSTM1</i> não nulo	4,69 $\pm$ 6,10 (29)	1,86 $\pm$ 1,96 (29)	4,58 $\pm$ 6,88 (24)
<i>GSTM1</i> nulo	3,88 $\pm$ 5,49 (34)	1,85 $\pm$ 2,22 (34)	4,12 $\pm$ 4,27 (33)
<i>GSTT1</i> não nulo	4,67 $\pm$ 5,86 (51)	2,04 $\pm$ 2,14 (51)	4,53 $\pm$ 5,74 (47)
<i>GSTT1</i> nulo	2,50 $\pm$ 5,05 (12)	1,08 $\pm$ 1,68 (12)	3,30 $\pm$ 4,07 (10)
<i>GSTP1 Ile/Ile</i>	4,67 $\pm$ 6,52 (27)	2,07 $\pm$ 2,42 (27)	2,71 $\pm$ 1,97 (24)
<i>GSTP1 Val/–</i>	4,33 $\pm$ 5,08 (27)	1,78 $\pm$ 1,83 (27)	6,67 $\pm$ 7,65 (24)
<i>CYP1A1 *1A/*1A</i>	5,72 $\pm$ 6,39 <sup>a</sup> (43)	2,37 $\pm$ 2,32 <sup>a</sup> (21)	4,32 $\pm$ 5,86 (37)
<i>CYP1A1 *2C/–</i>	1,13 $\pm$ 1,45 (16)	0,69 $\pm$ 0,60 (16)	4,75 $\pm$ 5,20 (13)
<i>CYP2E1 *1A/*1A</i>	3,78 $\pm$ 5,31 (55)	1,75 $\pm$ 2,06 (55)	4,53 $\pm$ 5,82 (49)
<i>CYP2E1 *5B/–</i>	8,57 $\pm$ 7,68 <sup>c</sup> (7)	3,00 $\pm$ 2,16 (7)	3,29 $\pm$ 2,29 (7)
<i>PON Gln/Gln</i>	4,79 $\pm$ 6,21 (34)	1,97 $\pm$ 1,95 (34)	3,03 $\pm$ 3,10 <sup>b</sup> (31)
<i>PON Arg/–</i>	4,21 $\pm$ 5,61 (23)	1,83 $\pm$ 2,39 (23)	6,35 $\pm$ 7,70 (20)
Expostos			
<i>GSTM1</i> não nulo	18,47 $\pm$ 9,70 (58)	10,78 $\pm$ 3,90 (58)	7,17 $\pm$ 4,67 (57)
<i>GSTM1</i> nulo	23,33 $\pm$ 14,46 (49)	11,51 $\pm$ 4,22 (49)	7,70 $\pm$ 5,11 (46)
<i>GSTT1</i> não nulo	20,29 $\pm$ 11,31 (79)	11,08 $\pm$ 3,84 (79)	7,17 $\pm$ 4,85 (77)
<i>GSTT1</i> nulo	21,82 $\pm$ 14,92 (28)	11,21 $\pm$ 4,67 (28)	8,12 $\pm$ 4,89 (26)
<i>GSTP1 Ile/Ile</i>	20,77 $\pm$ 13,16 (56)	11,16 $\pm$ 4,09 (56)	7,69 $\pm$ 4,81 (55)
<i>GSTP1 Val/–</i>	20,61 $\pm$ 11,41 (51)	11,06 $\pm$ 4,04 (51)	7,08 $\pm$ 4,93 (14)
<i>CYP1A1 *1A/*1A</i>	20,53 $\pm$ 12,40 (99)	11,15 $\pm$ 4,11 (99)	7,22 $\pm$ 4,79 (95)
<i>CYP1A1 *2C/–</i>	22,75 $\pm$ 11,50 (8)	10,63 $\pm$ 3,34 (8)	9,63 $\pm$ 5,40 (8)
<i>CYP2E1 *1A/*1A</i>	20,64 $\pm$ 12,39 (106)	11,10 $\pm$ 4,07 (106)	7,41 $\pm$ 4,85 (103)
<i>CYP2E1 *5B/–</i>	17,00 $\pm$ 7,07 (2)	10,00 $\pm$ 2,83 (2)	8,00 (1)
<i>PON Gln/Gln</i>	20,56 $\pm$ 9,73 (54)	11,04 $\pm$ 3,40 (54)	8,53 $\pm$ 4,94 <sup>b</sup> (51)
<i>PON Arg/–</i>	20,83 $\pm$ 14,55 (53)	11,19 $\pm$ 4,65 (53)	6,31 $\pm$ 4,55 (52)

<sup>a</sup> Dado significativo em relação ao genótipo variante do mesmo grupo (P < 0,01)

<sup>b</sup> Dado significativo em relação ao genótipo variante do mesmo grupo (P < 0,01)