

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS GENOTÓXICOS E CITOGENÉTICOS NA
POPULAÇÃO DE TRABALHADORES DE MINERAÇÃO DE CARVÃO DE
CERREJÓN (GUAJIRA-COLÔMBIA) UTILIZANDO DIFERENTES
BIOMARCADORES**

Dissertação de Mestrado

GRETHEL LEÓN MEJÍA

Porto Alegre - RS - Brasil

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS GENOTÓXICOS E CITOGENÉTICOS NA POPULAÇÃO DE
TRABALHADORES DE MINERAÇÃO DE CARVÃO DE CERREJÓN (GUAJIRA-COLÔMBIA)
UTILIZANDO DIFERENTES BIOMARCADORES**

Dissertação de Mestrado

GRETHEL LEÓN MEJÍA

Orientador:

Prof. Dr. João Antonio Pêgas Henriques

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e
Molecular como requisito parcial para obtenção do Grau de**


Mestre em Biologia Celular e Molecular

Porto Alegre - RS - Brasil

Junho de 2011

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

Este trabalho foi desenvolvido nas instalações do Laboratório de Pesquisa Biomédica e Biologia Molecular da Universidade do Sinú, Montería-Córdoba, Colômbia e nas instalações do Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências e do Instituto de Física da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Foi financiado pela COLCIENCIAS, a Vicerretoria de Pesquisa da Universidade do Sinú, pela Universidade do Cauca- Colômbia e UFRGS, Instituto de Educação para Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação Tecnológica-ROYAL - Brasil.



A Deus, por me dar grandes oportunidades na vida, por colocar em meu caminho as pessoas que me trouxeram ao Brasil.

Aos meus Pais: Hilda e Luis, aos meus Irmãos, Tios, Primos, afilhados e amigos, todos sempre me esperando com os braços abertos e dispostos a fazer uma festa de bem-vinda!

A todos eles muito obrigada, a espera valeu!

AGRADECIMENTOS

- ✚ Ao Professor Dr. **João Antonio Pêgas Henriques**, pela grande oportunidade de vir ao Brasil para minha formação, pela confiança e o conhecimento compartilhado, eu estarei eternamente grata.
- ✚ Ao Professor **Milton Quintana**, por ser o primeiro elo da cadeia, pelo apoio constante e contar com a sua amizade nos momentos mais difíceis.
- ✚ A Professora Dra. **Juliana da Silva**, que me ajudou para vir ao Brasil e fazer o mestrado, pela valiosa amizade que nos une, pelo grande apoio e importantes sugestões na realização deste trabalho.
- ✚ A **Izabel Villela**, sempre estarei agradecida por abrir as portas para chegar ao Brasil, por sua incondicional amizade, apoio e pelos bons momentos compartilhados.
- ✚ A **Miriam Benicio**, pela grande ajuda com as correções de Português, as sugestões neste trabalho e a valiosa amizade que temos.
- ✚ A **Lyda**, a grande amiga e parceira de luta com quem tive o prazer de fazer este trabalho, ela sabe que faltaram palavras para lhe agradecer.
- ✚ Ao **Sindicato de Trabalhadores do Cerrejón**, pela boa disposição neste trabalho.
- ✚ Aos Professores membros da minha Comissão de Acompanhamento: Prof. Dr. **Guido Lenz** e Prof. Dr. **Rogério Margis**, pelas acertadas sugestões em meu trabalho.
- ✚ A todos os **professores** do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, pelos valiosos ensinamentos durante as suas disciplinas.
- ✚ Aos **funcionários** do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, principalmente à **Silvia Centeno** e o **Luciano Saucedo**, duas pessoas sempre amáveis e dispostas na colaboração aos estudantes.
- ✚ Ao Professor **Jony Dias** e a **Rafaela Debastiani**, do Instituto de Física da UFRGS, pela amabilidade, pelas traduções e a ajuda nas análises das amostras pelo Método PIXE.

- ✚ Aos meus pais: **Hilda e Luis**, aos meus irmãos: **Luis Gabriel, Oscar David, Jorge Mario e Cristian**, aos meus tios (as): **Edelmira, Deyanira, Cielo, Jony, Beatriz**, aos meus primos: **Amy, Grey, Daisy, Jony, Flor, Luisa e Natalia**. Amo a todos vocês!
- ✚ Aos meus afilhados: **Gustavo Andrés, Gustavito e Esteban**. Os fofos da minha vida!
- ✚ A minhas amigas de Genotox: **Miriana Machado, Márcia Vaz, Bethânia Brenner, Jackeline Silveira**, muito obrigada pelas boas festas e pelos bons momentos.
- ✚ Aos meus amigos do Lab. 210: **Cristiano, Clara, Nusha, Patrícia, o Ângelo**, muito obrigada pelo carinho, por curtir a vida no Brasil com a gente.
- ✚ A **Carolina Uribe**, minha amiga de nacionalidade argentina, mas com um grande coração colombiano, que sempre fez os dias mais agradáveis na casa da Santana.
- ✚ Aos maravilhosos amigos que ficaram na Colômbia e que me esperam com os braços abertos: **Juan Dau Sánchez, María Cecilia Sánchez, Javier Arrieta, Yeni Guzmán, Oscar Montiel, Marco Támara, Ronald Ayazo, Hugo Brango, Juan Carvajal, Raúl Pedroza, Elena Rubio, Isaura Torres, Sandra Ochoa, Karina Bravo, Jose M. Jiménez, David Mestra, Jaime Luna, Shyrli Salcedo, Ciro campos, Olga Castaño, Ana María Mora, Diana Narváez, Magdalena Toscano, Nubia Yandar, Catalina Tovar e Francisco Buelvas**.
- ✚ Aos grandes amigos que conheci em Porto Alegre: **Dayana, Fabrício, Victoria, Leidy, Adriana, Ricardo, Will, Felipe, Leandro, Angélica, Fausto, Lila, Jose Vargas, Bruno e Maurício**.
- ✚ A todas aquelas pessoas cuja minha falta de memória não permitiu colocar os nomes no papel, mas que, em seu momento, foram uma grande ajuda para fazer este trabalho... a todos eles obrigada!

Obrigada!

ÍNDICE GERAL

LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	11
ABREVIATURAS	12
RESUMO	14
ABSTRACT	15
I. INTRODUÇÃO	18
1. O CARVÃO: GENERALIDADES	18
1.1. O carvão na Colômbia	21
1.1.1. Reservas	21
1.1.2. O carvão no Departamento de Guajira.....	21
1.1.2.1. Composição do Carvão de Cerrejón-Guajira	23
1.2. Agentes genotóxicos e o dano genético.....	24
1.3. Efeitos tóxicos relacionados à exposição ao carvão.....	25
1.3.1. Pó de carvão	26
1.3.1.1. ERO e o dano oxidativo no DNA.....	26
1.3.2. Agentes mutagênicos correlacionados à mineração de carvão	28
1.3.2.1. Metais pesados	28
1.3.2.2. Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (HAP)	28
2. BIOMONITOREAMENTO HUMANO	30
2.1. Ferramentas para a avaliação do risco genético: Os biomarcadores	31
2.1.1. Alterações citogenéticas: Biomarcadores de efeito.....	34
2.1.1.1. O Ensaio de Micronúcleos.....	34
2.1.1.1.1. MN em células epiteliais da mucosa oral	36
2.2. O Ensaio cometa: Biomarcador de Exposição.....	38
2.3. Método PIXE.....	41

II. OBJETIVOS

1. Objetivo Geral.....	46
2. Objetivos específicos.....	46

III. CAPITULO I

“Assessment of DNA damage in coal open-cast mining workers using the cytokinesis-blocked micronucleus test and the comet assay”	47
---	----

IV. CAPÍTULO II..... 55

V. DISCUSSÃO GERAL 65

VI. CONCLUSÕES

1. Conclusão Geral.....	75
2. Conclusões Específicas.....	75

VII. PERSPECTIVAS..... 77

VIII. BIBLIOGRAFIA..... 79

ANEXOS

<i>CYP1A1</i> , <i>GSTM1</i> AND <i>GSTT1</i> POLYMORPHISMS AND LACK OF MODULATION OF DNA DAMAGE IN OPEN-CAST COAL MINERS	93
CONSENTIMIENTO INFORMADO	119
QUESTIONÁRIO DO PROJETO	123

LISTA DE FIGURAS

I. INTRODUÇÃO

Figura 1. Localização da Guajira em Colômbia.....	22
Figura 2. Extração de carvão, mineração a céu aberto em Cerrejón-Guajira	23
Figura 3. Principais vias associadas com o desenvolvimento de doenças pulmonares induzidas pelo pó de carvão.....	27
Figura 4. Vias do metabolismo, geração de ERO e formação de adutos com o DNA depois da exposição a benzo[a]pireno	29
Figura 5. Esquema geral da formação de MN	35
Figura 6. Estrutura e diferenciação do epitélio oral	37
Figura 7. Aparência típica de uma lâmina ensaio cometa.....	39
Figura 8. Princípio básico da técnica PIXE	42
Figura 9. Espectro gerado a partir da análise de uma amostra.....	43

IV. CAPÍTULO II

Figura 1. Número de micronúcleos observados nas células dos indivíduos do grupo controle e do grupo exposto dividido por atividades nas áreas de trabalho (média ± desvio padrão). ***Diferença significativa em relação ao grupo controle, $p < 0.001$; Kruskal Wallis-Dunn correction	60
--	----

V. DISCUSSÃO GERAL

Figura 2. Gráfico da correlação linear entre a frequência de micronúcleos em linfócitos e na mucosa oral	68
--	----

ANEXOS

Figure 1. PCR-RFLP analysis for the presence/absence of the *CYP1A1MspI* polymorphism: Lane 1 a homozygous individual (*m1* allele without *MspI* site 340 bp fragment), Lane 2 heterozygote individual (*m1/m2* 340, 200 and 140 bp fragments) and in Lane 3 homozygous individual (*m2* allele with the *MspI* site) generates 200 and 140 bp fragments. M-Ladder marker **102**

Figure 2. Multiplex PCR products for the presence/absence of *GSTM1* and *GSTT1*: Lane 1: *GSTM1/T1* positive ; Lane 2: *GSTM1* null , *GSTT1* positive ; Lane 3: *GSTM1/T1* null ; Lane 4: *GSTM1* positive , *GSTT1* null . Band at 312 bp corresponds to the internal control (*CYP1A1* gene fragment).The presence or absence of *GSTM1* and *GSTT1* genes was detected by the presence or absence of a band at 480 bp (corresponding to *GSTT1*) and a band at 215 bp (corresponding to *GSTM1*) **103**

LISTA DE TABELAS

CAPITULO I

Table 1. Main demographic characteristics of the studied population: Non-exposed control and Exposed groups **51**

Table 2. Comet assay and Micronucleus test parameters in Non-exposed control and Exposed group divided by work areas activities (mean \pm standard deviation) **52**

IV. CAPÍTULO II

Tabela 1. Parâmetros de dano ao DNA (micronúcleos), de amplificação gênica (BUD) e de morte celular (cariorrética e cariólise) nos indivíduos expostos e não expostos (média \pm desvio padrão) **61**

Tabela 2. Concentração de elementos químicos nas amostras de sangue (ppm) do grupo exposto dividido por áreas de trabalho (média e desvio padrão) **63**

Tabela 3. Concentração média de elementos químicos nas amostras de sangue (ppm) do grupo exposto e grupo controle (média e desvio padrão)..... **64**

ANEXOS

Table 1. Distribution of *CYP1A1*, *GSTM1* and *GSTT1* genotypes and variant alleles frequencies in non-exposed control and exposed groups **106**

Table 2. Poisson regression analysis of Micronucleus: Effect of individual genotype in non-exposed control and coal open-cast mining residues exposed groups **107**

Table 3. Effect of individual genotype on Comet assay parameters in non-exposed and coal open-cast mining residues exposed groups (mean and standard deviation) **108**

ABREVIATURAS

ALS	Sítios álcali lábies
BN	Células binucleadas
BTU	Unidades Térmicas Inglesas
BUD	Broto nuclear
DI	Índice de dano
DSB	Quebras duplas de DNA
ERDA	Análise de Átomos por Recuo Elástico
ERO	Espécie Reativa do Oxigênio
eV	Elétron volt
ha	Hectares
HAP	Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos
IARC	Agência Internacional de Pesquisa do Câncer
keV	Kilo elétron volt
kg	Kilograma
km²	Quilômetros quadrados
KR	Cariólise
KR	Cariorrética
lb	Libras
mA	Miliampére
mbar	Milibar
MeV	Mega elétron volt

MGE	Eletroforese em Microgel
MJ	Megajulhos
MN	Micronúcleos
Mt	Milhões de Toneladas
MV	Megavolt
nA	Nanoampére
NO[•], NO₂[•]	Óxidos de nitrogênio
NRA	Análise por Reações Nucleares
O₂^{•-}	Radicais superóxidos
OH[•]	Radicais hidroxílicos
PAHs	Hydrocarbonetos Aromáticos Policíclicos
PIXE	Emissão de raios-X induzidas por partículas
ppm	Partes por milhão
RBS	Retroespalhamento Rutherford
ROO^{••}	Radicais peroxílicos
SCE	Troca de cromátides irmãs
SCGE	Ensaio cometa
SSB	Rompimentos simples
t	Toneladas
V	Volts

RESUMO

Durante as atividades de mineração de carvão são liberadas ao ambiente grandes quantidades de partículas de pó, cinzas, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP) e metais pesados. Uma vez no ambiente, estas substâncias constituem misturas complexas, um dos maiores riscos ocupacionais para a saúde e segurança dos trabalhadores, se levarmos em conta o efeito sinérgico, aditivo e potencializador da mistura resultante. Uma vez no organismo, este tipo de coquetel tem a capacidade de interagir com mecanismos celulares como ativação de macrófagos, células epiteliais e fibroblastos, e durante esta estimulação podem ser liberadas substâncias como espécies reativas de oxigênio (ERO), capazes de danificar importantes macromoléculas como o DNA. Compostos como os HAP, presentes nas misturas, apresentam uma atividade mutagênica e carcinogênica comprovada, pela capacidade que tem de formar adutos com as purinas depois da sua ativação metabólica. O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos genotóxicos, citogenéticos e a presença de metais na população de trabalhadores exposta aos resíduos da mineração de carvão de Guajira-Colômbia. Foram incluídos no estudo 100 trabalhadores expostos e 100 indivíduos controle. O grupo exposto foi dividido de acordo com suas diferentes atividades na área de mineração: (i) *transporte de carvão extraído* (ii) *manutenção de equipamento no campo*, (iii) *mineração de carvão* e (iv) *embarque de carvão*. Para a aplicação do teste ensaio cometa versão alcalina, foram usados linfócitos de sangue periférico e foram avaliados os parâmetros índice de dano (ID), tamanho da cauda e % de DNA na cauda. Para avaliar o dano cromossomal, foi utilizado o teste de micronúcleos em linfócitos e amostras de mucosa oral para avaliar a frequência de micronúcleos em 2000 células. O conteúdo de metais nas amostras do sangue foi analisado mediante a técnica de emissão de raios-X induzidas por partículas (PIXE). Nos biomarcadores avaliados nos ensaios cometa, micronúcleos em linfócitos e micronúcleos em mucosa oral, foram observados valores significativamente maiores no grupo exposto comparado com o grupo controle. Nos resultados da análise dos níveis de elementos químicos pelo método PIXE, foram encontradas quantidades significativamente maiores de Si e Al no grupo exposto, metais que estão presentes nas cinzas voláteis de carvão. Na análise dos resultados obtidos nos diferentes testes, não foi observada correlação entre a idade, o consumo de álcool e o tempo de serviço. Também não foi encontrada diferença significativa entre as atividades de mineração (áreas de trabalho) avaliadas. As informações geradas por este estudo são os primeiros dados para a Colômbia sobre os efeitos genotóxicos em trabalhadores expostos aos resíduos de mineração de carvão e contribuem para o estabelecimento de políticas adequadas de controle e prevenção para estas populações.

ABSTRACT

During coal mining activities, large quantities of coal dust, ashes, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH), and heavy metals are released at the environment. Once into the atmosphere, these substances constitute a complex mixture. This mixture became one of the most important occupational risks for workers health and safety due to synergistic, additive and enhancing effects. Once inside the organism this cocktail-like mixture can interact with cellular mechanisms related with reactive oxygen species (ROS) production, and being capable of cause damage in important macromolecules as DNA. Compounds such as PAH present in this mixture, has a proven mutagenic and carcinogenic activity for the capacity that they have to form adducts with the purines after its metabolic activation in the organism. The aim of the present study was to evaluate the genotoxic and cytogenetic effects together with the presence of metals, in an exposed workers population to coal mining residues of Guajira-Colombia. 100 exposed workers and 100 non-exposed control individuals were included in this study. The exposed group was divided according to different mining area activities: (i) *Transport of extracted coal* (ii) *Equipment field maintenance* (iii) *Coal stripping* and (iv) *Coal embarking*. For the Comet assay (alkaline version) peripheral blood lymphocytes were used. In this case, the evaluating the parameters were: damage index (DI), tail length and % of tail DNA. To determine chromosomal damage, the micronucleus frequency in lymphocytes and buccal mucose samples were used. 2000 cells per individual were evaluated. The metals content on blood samples were analyzed by emission of ray-X induced by particles technique (PIXE). The results evaluated with the comet assay and micronuclei in lymphocytes were found significantly higher in exposed group compared with the non exposed-control group. For these biomarkers no difference was observed between the exposed groups executing different mining activities. Analysis of metals by PIXE method, showed no significant differences between mining activities in the exposed group. Comparing element's levels in exposed and control group, we found significant higher values for Si and Al within the exposed group. Both metals are common in the coal fly ash. At the same time, we didn't find any correlation between age, alcohol consumption and time of service, and any values from the evaluated biomarkers. There also weren't found any significant differences between evaluated mining activities (work areas). To our knowledge, the information from this study is the first data generated about genotoxic effects in workers exposed to coal mining residues in Colombia and contributes to establish appropriate control and prevention politics on these populations.

ESTRUTURA DESTE TRABALHO

Este trabalho está dividido da seguinte forma: uma introdução geral, os objetivos (geral e objetivos específicos), um capítulo correspondente a um artigo científico publicado e outro capítulo onde são apresentados resultados complementares deste trabalho, uma discussão geral, as conclusões (geral e específicas), as perspectivas, referencias bibliográficas e os anexos.

Na introdução, são descritas as generalidades sobre o carvão, mineração, reservas de carvão ao redor do mundo e na Colômbia, efeitos tóxicos relacionados com a exposição ao carvão, agentes mutagênicos correlacionados com a mineração do carvão e ferramentas utilizadas no biomonitoramento humano para a avaliação do risco genético.

O Capítulo 1 apresenta um trabalho publicado na revista *Science of the Total Environment*, trabalho que abordou os efeitos genotóxicos e efeitos citogenéticos avaliados mediante o ensaio cometa e o teste de micronúcleos em linfócitos de sangue periférico na população de estudo.

O Capítulo 2 mostra resultados complementares relacionados com o Capítulo 1. Nesse capítulo foi avaliada a frequência de MN em células da mucosa oral e analisados os metais presentes nas amostras de sangue periférico de trabalhadores de mineração de carvão de Guajira - Colômbia.

Em seguida, é apresentada uma discussão geral que aborda os resultados desses dois capítulos, e a sua importância para a contribuição científica desse estudo, depois uma conclusão final e as perspectivas do trabalho.

Os anexos estão constituídos por um manuscrito submetido na revista *Toxicology*, que aborda os polimorfismos de genes de metabolismo *CYP1A1*, *GSTM1* e *GSTT1* e sua possível influência sobre a frequência de micronúcleos e o dano no DNA em linfócitos do sangue periférico. É também apresentado como anexo o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido que foi assinado pelos trabalhadores para fazer constar sua aceitação voluntária a este trabalho.

I. INTRODUÇÃO

I. INTRODUÇÃO

1. O CARVÃO: GENERALIDADES

O carvão possui uma estrutura química muito complexa, que consiste em uma mistura de substâncias químicas orgânicas constituídas por carbono, hidrogênio, nitrogênio, oxigênio e enxofre. É originado por transformações físicas e químicas de grandes acumulações vegetais depositadas em ambientes pantanosos, lacunares ou deltaicos. Além da geração elétrica, gaseificação e produção de coque, o carvão é empregado na produção de benzol, óleos, alcatrão e, mediante a liquefação, como substituto do petróleo (UPME, 2005).

Segundo *The American Society for Testing and Materials* (ASTMD, 2006), o carvão pode se dividir em quatro classes, conforme às propriedades referidas, à composição dos vegetais e às condições de pressão e temperatura (grau de metamorfismo) a que foram submetidos durante sua formação.

✚ **Antracita:** carvão duro, com alto conteúdo de carbono (86% a 98%), baixo conteúdo de matéria volátil e poder calorífico superior a 32,6 MJ/Kg (14.000 BTU/lb). É usado como combustível na geração de calor ou vapor na indústria térmica e siderúrgica, na fabricação de goma sintética, colorantes e purificação da água para consumo humano (filtros).

✚ **Hulha Betuminosa:** este tipo de carvão possui um menor conteúdo de carbono e menor poder calorífico que os carvões antracíticos. Por sua forma de uso, são também conhecidos como coquizáveis, usados em processos de obtenção do aço, e carvões térmicos, usados na produção de vapor para a geração de energia.

✚ **Hulha Sub-Betuminosa:** com menor poder calorífico que os carvões betuminosos, sua composição de carbono está entre 35% e 45% e possui um elevado conteúdo de material volátil, alguns com poder coquizável. É empregado na geração de energia elétrica e em processos industriais.

✚ **Lignite e turba:** são carvões de alta umidade e alto conteúdo de cinza e material volátil, o que faz com que tenham um baixo poder calorífico. Estes são empregados para a geração de calor (calefação), energia elétrica, para alguns processos industriais onde é requerida geração de vapor e, mais recentemente, têm sido fabricados briquetes de turba e lignite para a queima em fornos.

O carvão conta com 984.453 Mt em reservas mundiais medidas no final de 2009, sendo os principais produtores de carvão China, Estados Unidos, Índia, Austrália, Rússia e África do Sul, os quais são responsáveis por aproximadamente o 82% da produção mundial. A Colômbia é um dos maiores exportadores mundiais de carvão e tem a segunda maior reserva do mineral na América do Sul, atrás apenas do Brasil. De acordo com os níveis de produção e consumo atuais, as reservas mundiais de carvão serão suficientes para satisfazer a demanda durante os próximos 200 anos, pelo que o carvão é considerado a segunda fonte de energia primária devido a sua abundância e às políticas adotadas pelos países industrializados (IMC-Información Minera de Colombia, 2009).

Se estas projeções estão corretas, as consequências da mineração e da combustão do carvão sobre o ambiente terão efeitos importantes, o que faz necessário o monitoramento das populações expostas a este agente para conhecer ao estado atual do risco existente, o qual motiva ao estabelecimento de estratégias de controle, higiene e prevenção.

É conhecido que as atividades de mineração de carvão constituem uma das maiores fontes de contaminação do ambiente porque este processo libera grandes quantidades de substâncias no mesmo. Estas substâncias, uma vez liberadas no ambiente, formam misturas complexas consistente de CO_x, NO_x, SO_x, cristais de silício alumínio, quartzo, metais pesados (arsênico, boro, cádmio, cromo, chumbo, cobre,

selênio, ferro, zinco) e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP) (Zhou et al., 2005). A principal rota de exposição dos trabalhadores de mineração de carvão a estes resíduos potencialmente perigosos é pela inalação das partículas de pó de carvão provenientes dos processos de extração e manipulação. Atualmente, sabe-se que a inalação crônica das partículas de pó de carvão pode desencadear doenças pulmonares (pneumoconioses simples, fibrose massiva progressiva, enfisema, bronquite, perda de função pulmonar) até câncer. Recentes estudos têm conseguido estabelecer que algumas destas doenças poderiam ter sua origem no dano genotóxico gerado pela inalação deste mineral particulado, capaz de interagir com os macrófagos, células epiteliais e outras células, gerando a produção de grandes quantidades de espécies reativas do oxigênio (ERO) (Schins & Borm, 1999; Cooke et al., 2003).

As ERO têm sido envolvidas em processos de dano ao DNA, proliferação celular e o desenvolvimento de eventos iniciais do processo da carcinogênese (Cooke et al., 2003). Outros compostos relacionados com a mineração de carvão como os HAP apresentam uma atividade mutagênica reconhecida e têm sido associados com um aumento no risco de câncer de pulmão, pele e bexiga (Mastrangelo et al., 1996). Apesar de existirem algumas evidências sobre o risco genotóxico da exposição ao carvão (Da Silva et al., 2000; Celik et al., 2006; Donbak et al., 2005), o pó de carvão continua sendo classificado como não carcinogênico para humanos (grupo 3) pela Agência Internacional para a Pesquisa do Câncer (IARC, 1997).

Levando em consideração que na Colômbia não se conhecem programas unificados de cobertura direcionados ao estudo das doenças relacionadas com a exposição no ambiente de trabalho, nem programas nacionais de educação ao trabalhador relacionados com este assunto, é necessário uma primeira tomada de conhecimento dos fatores de risco dentro da cadeia de produção do carvão, com o propósito de fazer a intervenção e prevenção oportuna nas populações ocupacionalmente expostas a esta atividade de mineração.

1.1. O carvão na Colômbia

1.1.1. Reservas: a Colômbia é o país com as maiores reservas de carvão da América Latina, conta com recursos potenciais de 16.992 Mt e é o sexto exportador de carvão do mundo, com uma participação de 6,3%, o que equivale a 50 Mt anuais de carvão (UPME, 2005).

Com a taxa de exploração atual, as reservas medidas de carvão na Colômbia asseguram mais de 120 anos de produção, suficientes para participar da grande escala no mercado internacional e abastecer a demanda interna.

O carvão, fonte geradora de divisas e de emprego, concentra 47% da atividade mineira nacional e representa 1% do produto interno bruto colombiano, com cerca de 3,4 bilhões de pesos. Nos últimos anos, tem-se consolidado no segundo produto de exportação nacional depois do petróleo e estima-se que, sob as condições de mercado atuais, até 2015 poderia superar as exportações de petróleo (UPME, 2005).

A Colômbia conta com recursos de carvão para participar no mercado mundial por muito tempo. As reservas medidas, localizadas principalmente na Costa Atlântica, compreendem 90% do carvão térmico, que por sua vez corresponde a 98% do carvão nacional. 95% das reservas localizam-se nos departamentos de Guajira, Cesar, Córdoba, Norte de Santander, Cundinamarca, Boyacá, Antioquia, Valle del Cauca e Cauca (UPME, 2005).

1.1.2. O carvão no Departamento de Guajira: na Costa Norte da Colômbia ou Costa Atlântica, estão localizados os Departamentos de Guajira, Cesar e Córdoba, os quais registram as maiores reservas de carvão térmico da Colômbia, cuja exportação é facilitada por se encontrar em zona costeira. Os carvões desta região são betuminosos altos em voláteis, de boa qualidade do ponto de vista de seu poder calorífico, estimado em 27,02 MJ/Kg (11.600 BTU/lb) em média, com baixos conteúdos de umidade, cinzas e enxofre, que os fazem competitivos no mercado internacional para serem utilizados na indústria e na geração de calor, vapor e eletricidade. A mineração desta zona é bastante mecanizada e sua exploração na maioria dos casos é a céu aberto.



Figura 1. Localização da Guajira em Colômbia

Em Guajira, encontra-se a jazida de Cerrejón (figura 1), próxima ao setor centro-sul, na bacia dos rios Cesar e Ranchería. A zona de exploração de Cerrejón é dividida em três setores:

- *Cerrejón Norte*: jazida que possui uma área de 380 km² (38.000 ha) e reservas medidas de 3.000 Mt; a infraestrutura deste setor conta com uma linha férrea de 194 km entre a mina e Puerto Bolívar, porto de exportação que possui dois molhes aptos para receber barcos com capacidades entre 35.000 e 150.000 t.

- *Cerrejón Central*: este setor tem uma área de 100 km² (10.000 ha) e suas reservas medidas são de 670 Mt.
- *Cerrejón Sur*: este setor corresponde à continuação da formação de “El Cerrejón” e na atualidade tem-se determinado reservas carboníferas por volta de 263 Mt (UPME, 2005).



Figura 2. Extração de carvão, mineração a céu aberto em Cerrejón-Guajira (UPME, 2005).

1.1.2.1. Composição do Carvão de Cerrejón-Guajira:

Alguns parâmetros de qualidade do carvão do Cerrejón são: umidade (~10%), voláteis (~30%), cinza (~8%), enxofre (~1%), carvão (~70%), hidrogênio (~6%), oxigênio (~5%), nitrogênio (~1%). Dentro dos metais traços: As (1,9ug/g), B (45ug/g), Ba (76,9ug/g), Be (0,25 ug/g), Br (0,11 ug/g), Cd (0,15 ug/g), Co (2,3 ug/g), Cr (9,7 ug/g), Cu (5,7 ug/g), Hg (0,06 ug/g), Mn (31 ug/g), Mo (1,95 ug/g), Ni (7 ug/g), Pb (0,18 ug/g), Se (3,7 ug/g), Sb (0,55 ug/g), V (24,5 ug/g), Zn (14 ug/g). Óxidos como

SiO₂ (62,61%) Al₂O₃ (20,73%), Fe₂O₃ (8,59%), CaO (2,40%), MgO (1,48%), TiO₂ (0,99%), BaO (0,13%), Mn₃O₄(0,05%), Na₂O (0,54%), K₂O (2,28%), P₂O₅ (0,18%) (ETSU & Department of Trade and Industry, 2000).

1.2. Agentes genotóxicos e o dano genético

A indução de dano genético pela exposição a agentes genotóxicos é um processo que se realiza em vários passos. Durante o processo, o agente xenobiótico entra no organismo, é absorvido e distribuído e atravessa as membranas celulares, onde eles podem apresentar dois tipo de ação:

- a) Ação direta: o agente xenobiótico não requer ativação e reage com grupos nucleofílicos nos ácidos nucleicos como, por exemplo, os gases mostarda nítrico e sulfúrico.
- b) Ação indireta: o agente xenobiótico requer ativação por enzimas como, por exemplo, os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, aminas, etc.

Os compostos que não requerem ativação chamam-se carcinógenos primários ou de ação direta. Os compostos que requerem ativação metabólica chamam-se procarcinógenos (Repetto & Repetto, 2009).

Os produtos reativos gerados pelo metabolismo interagem com o DNA, produzindo lesões pré-mutagênicas, ou adutos, que em muitos casos fixam-se e produzem mutações pontuais no DNA, tais como substituições de bases, transições e transverções, ou mutações que mudam o quadro de leitura. Não obstante, em muitos casos, as lesões pré-mutagênicas são eficientemente reparadas pelas enzimas que funcionam nos organismos para manter a integridade e fidelidade dos ácidos nucleicos; se a reparação é ineficiente, promove-se a fixação de erros no DNA, ocasionando a geração de lesões mais complexas e permanentes como as mutações (Arnaiz, 1998).

1.3. Efeitos tóxicos relacionados à exposição ao carvão

Os efeitos da exposição ao carvão têm sido estudados usando bactérias (Nakajima et al., 2008), morcegos (Zocche et al., 2010), roedores (Da Silva et al., 2000, León et al., 2007) e células humanas (Celik et al., 2007). Em alguns estudos realizados em trabalhadores expostos aos resíduos de mineração subterrânea de carvão, foi demonstrado pelos testes de troca de cromátides irmãs, aberrações cromossômicas e micronúcleos em linfócitos de sangue periférico, que a exposição ocupacional ao pó de carvão conduz a uma significativa indução de danos citogenéticos (Donbak et al., 2005; Santa María et al., 2007).

Lan e He (2004) realizaram, na China, um estudo de epidemiologia molecular sobre a relação entre a queima de carvão e o risco de câncer pulmonar. Celik et al. (2005), na Turquia, avaliaram os efeitos da combustão do carvão em trabalhadores expostos a uma usina de queima deste mineral, demonstrando dano citogenético significativo atribuído aos efeitos cumulativos das diferentes substâncias contidas no carvão e às emissões gasosas durante a queima. Shangina et al. (2006) avaliaram a exposição ocupacional em quatro países da Europa (Polônia, Romênia, Rússia e Eslováquia), encontrando que a exposição laboral ao pó de carvão pode ter um papel importante no desenvolvimento de câncer de laringe e hipofaringe. Neste cenário, Cohn e colaboradores (2008) avaliaram a relação da inalação de partículas de pó de carvão com a geração de ERO (peróxido de hidrogênio e radicais hidroxilo), e consequentemente com o desenvolvimento de doenças pulmonares como a pneumoconiose. Recentemente, Tuluze et al. (2011) mostraram a toxicidade do pó de carvão em células de trabalhadores, encontrando que estas partículas geram oxidação lipídica e de proteínas, conduzindo ao desequilíbrio do sistema antioxidante.

Apesar dos efeitos da exploração, combustão e manipulação do carvão sobre os sistemas biológicos referenciados em algumas pesquisas ao redor do mundo, mesmo assim não existem informações conclusivas, necessárias para a determinação precisa dos riscos genéticos da exposição aos resíduos de mineração de carvão.

1.3.1. Pó de carvão

Além da toxicidade ligada ao componente químico, outros elementos tóxicos do carvão podem ser originados durante sua extração, processamento ou manipulação. Durante a trituração do carvão, são produzidas enormes quantidades de partículas de pó. A inalação crônica deste pó de carvão pode produzir várias desordens pulmonares, incluindo a pneumoconiose simples, fibrose massiva progressiva, enfisema, bronquite e perda de função pulmonar (Schins & Born, 1999).

Segundo recentes estudos, tem sido estabelecido que tais doenças têm um componente genético, que obedeceria à capacidade do pó de carvão de produzir interações complexas dentro da maquinaria celular, em mecanismos relacionados à produção de ERO. A inalação contínua de partículas de pó de carvão é uma importante fonte celular e não celular de espécies reativas do oxigênio (ERO) no pulmão, podendo estar significativamente envolvidas no dano de células alvo deste tecido e de outras linhagens celulares, depois de se difundir e circular pela corrente sanguínea (Schins & Born, 1999).

1.3.1.1. ERO e o dano oxidativo no DNA

As espécies reativas do oxigênio são a fonte mais importante de danos genômicos em humanos. Muitas afecções da saúde física e mental que, além do câncer, incluem doenças degenerativas comuns e envelhecimento acelerado são atribuídas ao lento e paulatino desbalanço criado pelo estresse oxidativo (Camargo, 2006). Os alvos de ataque das ERO são macromoléculas como os lipídios (peroxidação lipídica), proteínas, carboidratos e ácidos nucléicos (DNA) (Henriques et al., 2001).

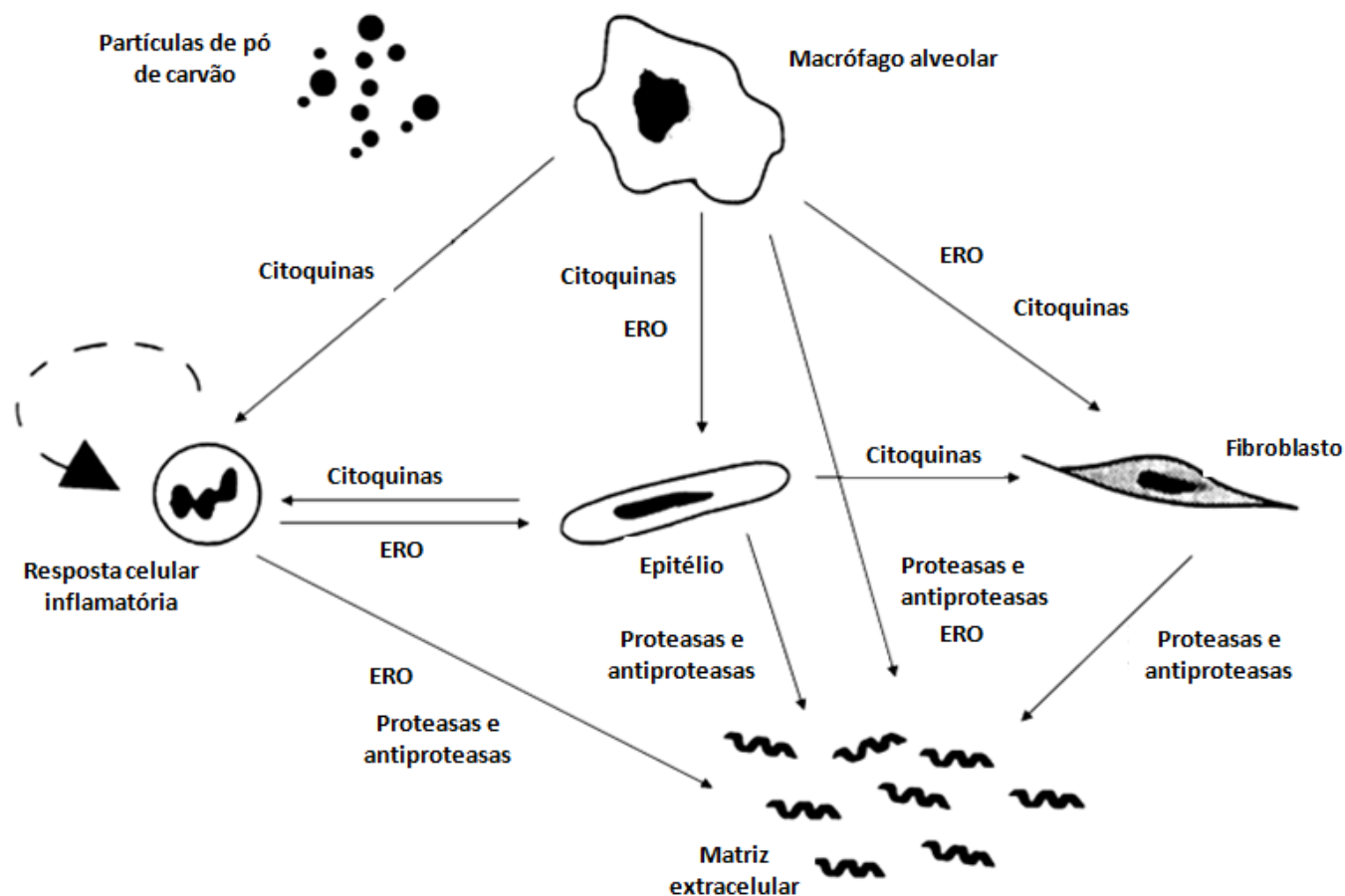


Figura 3. Principais vias associadas com o desenvolvimento de doenças pulmonares induzidas pelo pó de carvão. Adaptado de Schins & Born, (1999).

As ERO compreendem numerosos radicais, entre os quais estão os radicais hidroxílicos ($\text{OH}\cdot$), superóxidos ($\text{O}_2\cdot^-$), óxidos de nitrogênio ($\text{NO}\cdot$, $\text{NO}_2\cdot$) e radicais peroxílicos ($\text{ROO}\cdot$), muitos dos quais induzem mutações pontuais e aberrações cromossômicas nas células, produzidas principalmente pela indução de alterações e modificações oxidativas. Tais mudanças podem incluir a indução de rompimentos de cadeia simples no DNA, modificação oxidativa do DNA, modificação de bases, mudanças nas sequências, ativação das quinases, ativação de proto-oncogenes e a inativação de genes supressores de tumores (Cooke et al., 2003).

1.3.2. Agentes mutagênicos correlacionados à mineração de carvão

1.3.2.1. Metais pesados

Entre os elementos que ocorrem naturalmente e que aparecem associados com problemas de toxicidade estão incluídos os metais, que além dos hidrocarbonetos, também aparecem em altas concentrações no carvão. Exemplo destes elementos são o cobre (Cu), chumbo (Pb), cádmio (Cd), níquel (Ni), vanádio (V), zinco (Zn) e enxofre (S), que estão correlacionados com as atividades de mineração e combustão do carvão (Jegadeesan et al., 2008, ATSDR, 1993).

Na atualidade é pouco entendida e existem numerosas controvérsias sobre a carcinogênese dos metais pesados em humanos (ATSDR, 1993). Porém, uma causa muito provável de carcinogênese é o aumento nas lesões do DNA, aumento da geração de espécies reativas do oxigênio e/ou a interferência nos processos de reparo do DNA (Zocche et al., 2010, Kasprzak et al., 1997).

1.3.2.2. Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (HAP)

Os HAP se formam quando o material orgânico, constituído pelo carbono e hidrogênio, é submetido a processos pirólicos de combustão incompleta. Devido ao fato destes processos poderem acontecer em qualquer lugar dentro de um ecossistema, não é surpreendente que os HAP e os seus compostos hetero-aromáticos relacionados possam ser introduzidos no ambiente através de fontes naturais ou antrópicas. As combustões espontâneas que acontecem nos centros de armazenamento do carvão convertem-se numa das principais causas de produção de HAP, como estudado nas minas de carvão de Candiota, Rio Grande do Sul, Brasil (Da Silva et al., 2000).

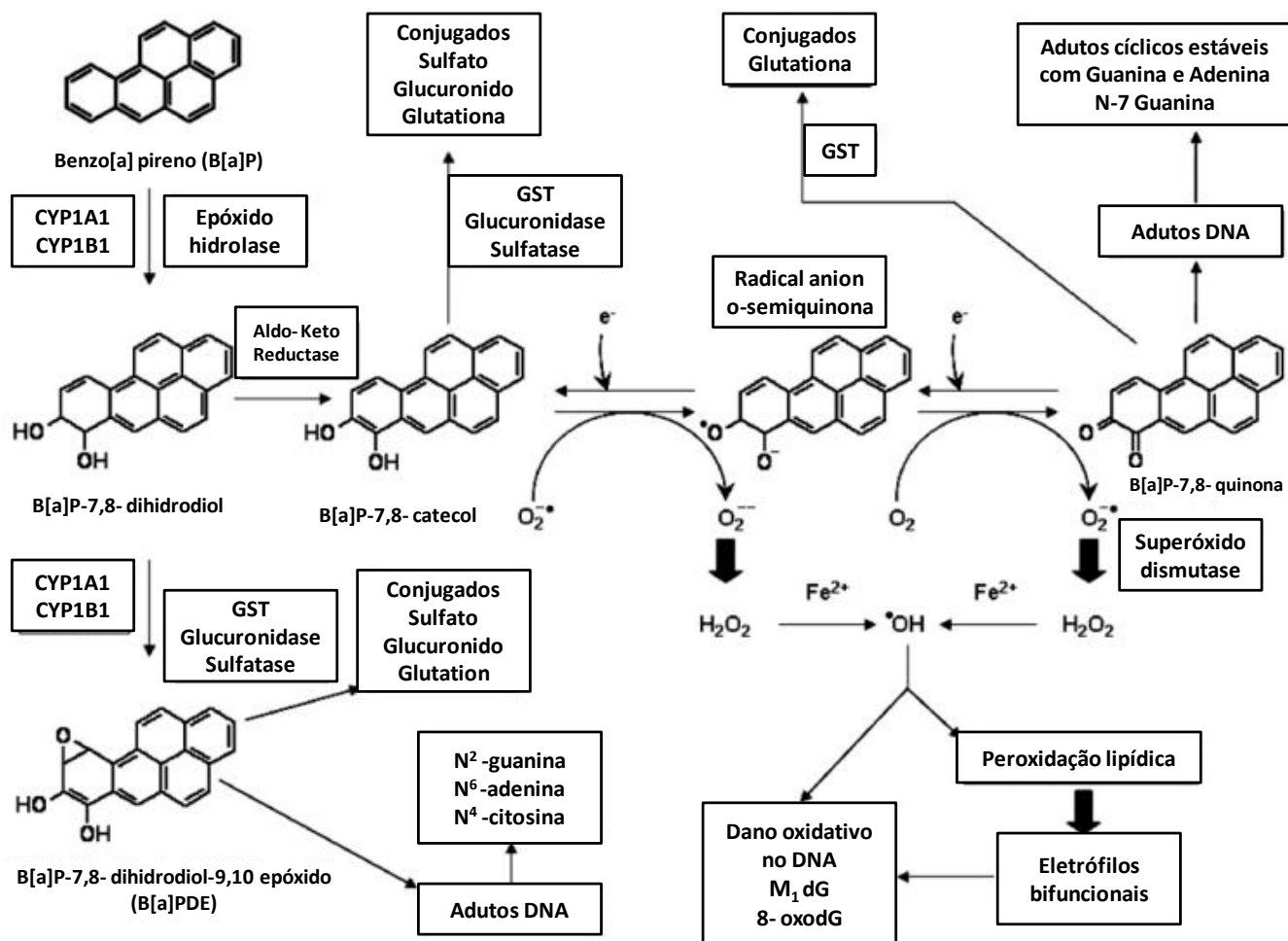


Figura 4. Vias do metabolismo, geração de ERO e formação de adutos com o DNA depois da exposição a benzo[a]pireno. Adaptado de Singh et al., (2007).

A maioria dos HAP são mutagênicos e/ou carcinogênicos, com capacidade de produzir lesões sobre o DNA do tipo quebras simples. Além disso, o metabolismo *in vivo* pode produzir metabólitos eletrofílicos que se ligam de forma covalente ao DNA (Baird et al., 2005) e formam adutos com as purinas, especialmente com a guanina, depois da sua ativação metabólica, o que envolve o complexo enzimático P450 (Pastor et al., 2002).

Um dos mecanismos pelos quais os ERO são produzidos é o processo do ciclo redox associado ao metabolismo de xenobióticos. Os HAP estão envolvidos no processo devido à formação de metabólitos de quinona a partir dos HAP, que pode induzir a formação de ERO via ciclo redox. Na figura 4, é mostrado como a exposição a um carcinógeno como benzo[*a*]pyrene (B[*a*]P) poderia conduzir à geração de dano oxidativo e à formação de adutos DNA- B[*a*]P seguido da ativação ao metabolito reativo B[*a*]P diol epoxide. O metabolito catechol é regenerado mediante a redução de dois elétrons NADPH-dependentes do metabolito da quinona resultante no ciclo redox (Singh et al., 2007).

2. BIOMONITOREAMENTO HUMANO

Nas últimas décadas, a integridade genética da população humana ficou comprometida pela grande atividade industrial, que provoca a exposição à produtos químicos e agentes genotóxicos. Além disso, existem outros fatores capazes de influir na integridade cromossômica, tais como, estilo de vida, mudanças climáticas (devido ao progressivo enfraquecimento da camada de ozônio), tratamentos médicos, alguns polimorfismos genéticos, etc. É importante então determinar o que se conhece como um nível “aceitável” de dano genético em uma população concreta, realizar ensaios de genotoxicidade de maneira rotineira e monitorar aqueles indivíduos que, por sua ocupação laboral ou estilo de vida, se encontram mais expostos ou com maior risco de sofrer alterações que podem modificar sua estabilidade genética (Zalacain et al., 2005).

Com este propósito, são realizados estudos de biomonitoramento, que tentam estabelecer a relação entre fatores ambientais e doenças, detectando alterações iniciais em fases ainda não malignas. Alguns estudos de biomonitoramento são baseados na análise dos compostos químicos ou de seus metabólitos em amostras de sangue, urina, pelos, etc. Outros, avaliam o risco da exposição mediante a determinação das possíveis alterações, tanto físicas como bioquímicas, induzidas nos indivíduos. No caso dos compostos genotóxicos, o biomonitoramento utiliza ensaios

de genotoxicidade e mutagenicidade para poder realizar uma avaliação do dano no material genético (Pastor, 2002). O objetivo fundamental dos estudos de biomonitoramento é então a prevenção de problemas de saúde mediante a identificação da causa ambiental que a origina.

2.1. Ferramentas para a avaliação do risco genético: Os biomarcadores

Um método de quantificar a exposição à xenobióticos e seu possível impacto sobre o organismo é o uso de procedimentos de monitorização biológica por meio de biomarcadores.

Os marcadores biológicos ou biomarcadores são as mudanças que podem ser medidas, sejam estas bioquímicas, fisiológicas ou morfológicas, que se associam à exposição a um tóxico ou qualquer alteração bioquímica precoce, cuja determinação nos líquidos biológicos, tecidos ou ar exalado permita avaliar a intensidade da exposição ao risco para a saúde (Ramírez, 2006). Os biomarcadores são utilizados para avaliar o risco mutagênico e carcinogênico. Para que se desenvolva o câncer induzido, o agente carcinogênico deve estar no ambiente e posteriormente entrar no organismo e, se necessário, ser metabolizado para reagir com diferentes macromoléculas. Ao final, se for induzido um dano genético, este pode ser visualizado mediante técnicas citogenéticas ou moleculares (Pastor et al., 2002).

A identificação de marcadores de genotoxicidade de produto(s) suspeito(s) de causar dano é útil, uma vez que pode definir um estado de pré-patogênese, de vital importância para a prevenção da enfermidade, que é o objetivo final do biomonitoramento. Para chegar a este objetivo, são necessárias duas etapas: 1) detectar exposições humanas a carcinógenos ambientais; 2) determinar efeitos genotóxicos *in vivo* (Pastor et al., 2002).

A utilização conjunta de biomarcadores genéticos e de ferramentas de epidemiologia clássica (histórico clínico e questionários) tem permitido a identificação de efeitos precoces, pela exposição ocupacional, a distintos compostos

poluentes ao redor do mundo (Pastor, 2002; Agova et al., 2005; Martino-Roth et al., 2003; Srám et al., 1998).

Os biomarcadores constituem, assim, uma ferramenta útil para avaliar o risco potencial das diferentes exposições ambientais. Estão divididos em três grupos: *Biomarcador de Exposição*, *Biomarcador de Efeito* e *Biomarcador de Susceptibilidade*.

- Um *biomarcador de exposição* pode ser um composto exógeno ou um metabólito que entra no corpo, um produto interativo entre o composto (ou metabólito) e um componente endógeno, ou qualquer outro fato relacionado com a exposição. O mais habitual é que os biomarcadores de exposição a compostos estáveis como os metais compreendam medições das concentrações do metal em amostras apropriadas como o sangue, o soro ou a urina. No caso das substâncias voláteis, pode ser avaliada sua concentração no ar espirado (em comparação com a inalação de ar livre de contaminação). Se o composto é metabolizado no corpo, pode ser escolhido um ou vários metabólitos como biomarcadores de exposição; os metabólitos são avaliados, em geral, em amostras de urina (Grandjean, 2001). Se houve a entrada do composto no corpo e houve interação com o material genético (mutágenos/carcinógenos electrofílicos), estes eventos podem se detectar pela existência de adutos em proteínas (albumina e hemoglobina) e no DNA (células da linha branca, urina, tecidos), assim como pela formação de troca de cromátides irmãs (SCE), refletindo uma exposição primária. Um resultado positivo a este nível não indica necessariamente consequências adversas, uma vez que parte do dano genotóxico primário pode ser reversível (Pastor, 2002).

Durante os últimos anos, o ensaio cometa ou SCGE tem sido utilizado como uma ferramenta útil para estudos de biomonitoramento humano (Valverde & Rojas, 2009; Olewińska et al., 2011; García-Lestón et al., 2011). Na sua versão alcalina, este ensaio pode ser usado para a detecção de uma ampla gama de danos no DNA, tais como rompimentos simples (SSB), sítios álcali lábies (ALS) e, sob algumas condições, entrecruzamentos do tipo DNA-proteínas ou DNA-DNA (Brendler-Schwaab et al.,

2005). Estes parâmetros, determinados pelo ensaio cometa, têm sido utilizados no mundo inteiro com uma alta sensibilidade, como marcadores de efeito da exposição ocupacional a pesticidas (Paiva et al., 2011; McCauley et al., 2008), anestésicos (Braz et al., 2011; Izdes et al., 2010), radiação (Balachandar et al., 2011) e estireno (Teixeira et al., 2010).

- *Biomarcadores de efeito* medem o dano genético já processado pelo organismo. As lesões no DNA, uma vez processadas, podem ser convertidas em mudanças permanentes nas células (mutações). Como são efeitos fixados, refletem danos correspondentes a exposições passadas, as quais são úteis para detectar dano acumulativo (Pastor, 2002). Tradicionalmente, os biomarcadores de efeito têm sido os mais utilizados nos estudos de biomonitorização humana. Um grupo de parâmetros dentro deste tipo de biomarcadores de efeito é o que se refere aos efeitos genotóxicos. Em estudos de monitoramento ocupacional, estes efeitos podem ser detectados mediante a formação de micronúcleos (Ergene et al., 2007), troca de cromátides irmãs (Jayakaran & Thomas, 2005) e aberrações cromossômicas (Bonassi et al., 2008).
- *Biomarcadores de susceptibilidade* baseiam-se na identificação de diferenças genéticas inter-individuais que fazem com que um indivíduo seja mais susceptível ou responda de jeito diferente, com um maior risco para a sua saúde, frente a diferentes exposições ambientais. Isto pode ser devido ao fato de possuir mais ativos os processos de bioativação ou possuir diminuídas suas capacidades de detoxificar, de excretar ou de reparar danos. A capacidade de reparação do dano genético também está determinada geneticamente, e aqueles indivíduos deficientes nos mecanismos de reparação podem sofrer maiores níveis de dano genético irreversível, inclusive frente a exposições de baixa intensidade (Pastor et al, 2002).

2.1.1. Alterações citogenéticas: Biomarcadores de efeito

Muitas das alterações espontâneas ou induzidas que são produzidas no DNA são traduzidas em rupturas e perdas cromossômicas. Seja qual for o origem, algumas alterações podem ser reparadas e voltar ao seu estado inicial. Se este reparo não ocorre ou se ocorre incorretamente, são provocados diferentes tipos de anomalias, algumas delas detectáveis mediante diferentes técnicas citogenéticas e/ou moleculares. As técnicas citogenéticas mais utilizadas para detectar mudanças cromossômicas estruturais e numéricas, para avaliar o risco genético de determinadas populações expostas a mutágenos, são as análise de aberrações cromossômicas, troca de cromátides irmãs e micronúcleos. Essa é a causa da importância de se conseguir localizar e quantificar as alterações cromossômicas, já que podem ser muito úteis para descobrir cedo os efeitos de danos genotóxicos que podem terminar mais adiante em uma enfermidade. É por isso que estes biomarcadores se convertem em uma ferramenta efetiva não só para a avaliação do risco, mas também para a sua predição (Pastor et al, 2002).

2.1.1.1. O Ensaio de Micronúcleos

O ensaio de micronúcleos é um dos testes de genotoxicidade mais frequentemente utilizado em mamíferos e usado na avaliação das consequências genotóxicas das exposições ambientais e laborais a mutágenos (Qiu et al., 2011; Welge et al., 2011; Ergene et al., 2007).

Os micronúcleos (MN) são originados de fragmentos de cromossomas ou cromossomas inteiros que ficam isolados durante a divisão mitótica, e que podem ser visualizados no citoplasma das células filhas como pequenos núcleos adicionais próximos ao núcleo principal (Fenech et al., 2011). Os MN podem ser formados de maneira espontânea ou como resposta à ação de determinados agentes (clastogênicos e/ou aneugênicos), como resultado da perda de fragmentos cromossômicos e/ou cromossomas inteiros durante a divisão celular (Ceppi et al., 2010; Ergene et al., 2007; Budak & Celik, 2011).

As rupturas cromossômicas originam fragmentos cromossômicos acêntricos que, por não possuírem centrômero, não foram incluídos nos núcleos filhos durante a divisão celular, por não poderem se unir ao fuso mitótico na anáfase. Estes fragmentos formam membrana nuclear e aparecem no citoplasma como pequenos núcleos, como pode ser visto na figura 5. Se o dano genotóxico afeta a proteínas do cinetócoro, no centrômero ou no fuso mitótico, o mais provável é que seja produzido um retardo no movimento mitótico e um desequilíbrio na distribuição dos cromossomas, provocando a perda dos cromossomas atrasados durante a anáfase, e que os mesmos sejam envolvidos por membrana nuclear, como acontece com os fragmentos cromossômicos, originando também micronúcleos (Fenech et al., 2011).

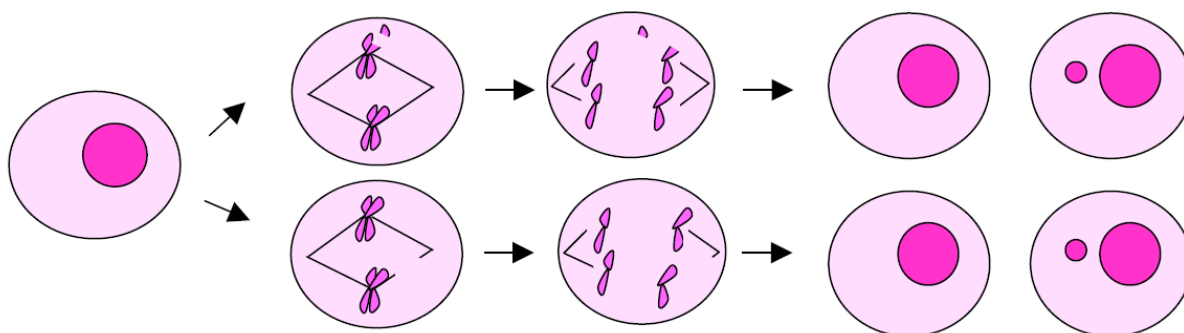


Figura 5. Esquema geral da formação de MN. Adaptado de Pastor et al.(2002).

Em humanos, os micronúcleos podem ser facilmente avaliados em eritrócitos, linfócitos e células epiteliais esfoliadas (exemplo: oral, urotelial, nasal) para obter uma medida do dano genômico induzido *in vivo*. O ensaio pode ser executado em células da mucosa oral e em outras células esfoliadas originadas da rápida proliferação do tecido epitelial, sem a necessidade da divisão nuclear *ex vivo*. Assim, as culturas celulares requeridos para os ensaios citogenéticos baseados na análise de cromossomas metafásicos, tais como aberrações cromossômicas e intercâmbio de cromátides irmãs, não são necessárias (Holland et al., 2008).

2.1.1.1.1. MN em células epiteliais da mucosa oral

O fato de que uma porcentagem muito elevada dos cânceres tenha uma origem epitelial (Rosin, 1992) sugere que o ensaio de MN em células epiteliais pode ter um enorme potencial epidemiológico (Pastor et al., 2002).

O ensaio de micronúcleos em células bucoepiteliais oferece a oportunidade de revelar perdas cromossômicas (micronúcleos) e alterações da dinâmica de troca celular epitelial e assim obter uma medida do dano genético induzido *in vivo* (Ceppi et al., 2010) associado a exposições ambientais, acidentais e laborais de produtos químicos.

Os tecidos epiteliais são tecidos que proliferam muito rapidamente e muitos estão em contínuo contato com o ambiente. Além disso, as células esfoliadas da mucosa oral podem ser coletadas em grande número, rapidamente e de uma forma não invasiva (Bonassi et al., 2007). As mudanças citogenéticas nestes tecidos são difíceis de estudar pelos métodos tradicionais (aberrações cromossômicas ou troca de cromátides irmãs) porque precisam existir metáfases para estas análises (Pastor et al., 2002).

Diferente de outros tipos celulares, o epitélio é formado por várias camadas de células que vão sendo esfoliadas a medida que alcançam a superfície. Por esse motivo, o dano genético que será detectado é o que aconteceu nas camadas basais, local onde as células se dividiram. A rápida renovação dos tecidos epiteliais faz que o máximo índice de formação de MN apareça entre 1 e 3 semanas depois da exposição ao agente genotóxico (Celik et al., 2003; Holland et al., 2008), que é o tempo necessário para que as células migrem das camadas basais do epitélio até a superfície (Figura 6).

Em comparação com outros ensaios de genotoxicidade atualmente utilizados em biomonitorização humana, o ensaio de MN com células de esfoliação apresenta uma série de vantagens:

- É simples e rápido. Apesar de ser uma vantagem comum à técnica de MN com qualquer tipo celular, as células de esfoliação não precisam ser cultivadas (como é necessário com linfócitos). Assim, o seu processamento requer menor tempo e um equipamento básico.
- O alvo está bem definido e pode ser reconhecido facilmente.
- A simplicidade da coleta das células, junto como uma metodologia não invasiva faz o teste aplicável a um grande número de amostras (Stich et al., 1983; Pastor et al., 2002; Budak & Celik, 2011).

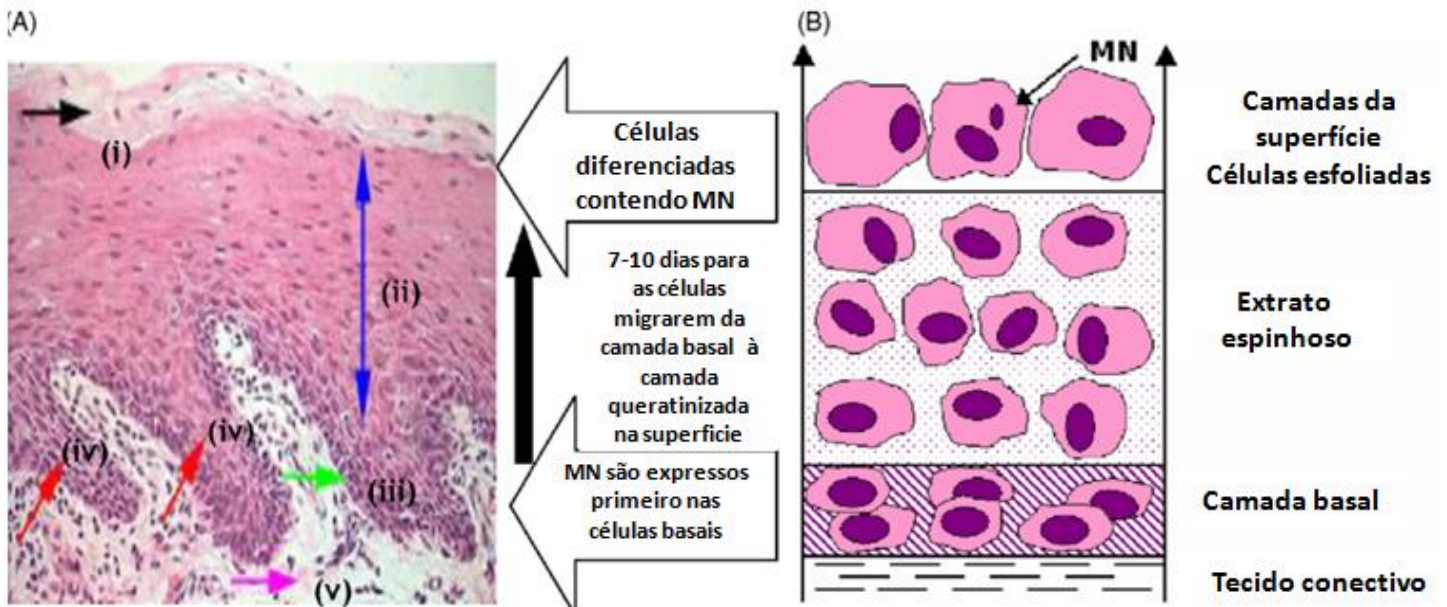


Figura 6. Estrutura e diferenciação do epitélio oral. Adaptado de Holland et al.(2008)

Os inconvenientes próprios da técnica (elevada variabilidade intra e interindividual, e diversidade de critérios de avaliação) continuam existindo e são os principais problemas que apresenta a técnica de MN com as células de esfoliação. Outra limitação é que as células de esfoliação sob processos degenerativos podem produzir anormalidades difíceis de distinguir dos MN (Holland et al., 2008). Porém, estas anormalidades podem estar correlacionadas com as exposições em estudo e ser

resultado de fenômenos relevantes por si só na carcinogênese (Ergene et al., 2007; Budak & Celik, 2011).

A frequência basal média dos MN nas células de esfoliação epitelial da mucosa oral tende a ser inferior à observada nas células sanguíneas. Existe muita variabilidade entre os valores que são obtidos nos indivíduos controles, que estão em uma faixa compreendida entre 0,03% e 0,47% (Titenko-Holland et al., 1994).

2.2. O Ensaio cometa: Biomarcador de Exposição

O ensaio cometa, também chamado Ensaio em Gel em Células Individuais (SCGE) ou de Eletroforese em Microgel (MGE), foi introduzido como tal por Östling e Johanson em 1984, como uma técnica microeletroforética para a visualização direta do dano no DNA em células individuais (Valverde & Rojas, 2009; Liao et al., 2009).

O fundamento sob o qual foi desenvolvida esta técnica está baseado na irradiação de uma pequena quantidade de células, as quais são suspensas em uma camada delgada de agarose sobre uma lâmina de microscópio. As células são então submetidas a um processo de eletroforese seguido de coloração com um corante fluorescente. A corrente elétrica aplicada durante a eletroforese arrasta o DNA carregado negativamente de dentro do núcleo, permitindo que fragmentos de DNA quebrados ou desenovelados migrem a uma distância considerável, resultando em imagens que, por sua aparência, foram denominadas “cometas” (Moller, 2006; Valverde & Rojas, 2009; Hartley et al., 2011), como se mostra na figura 7.

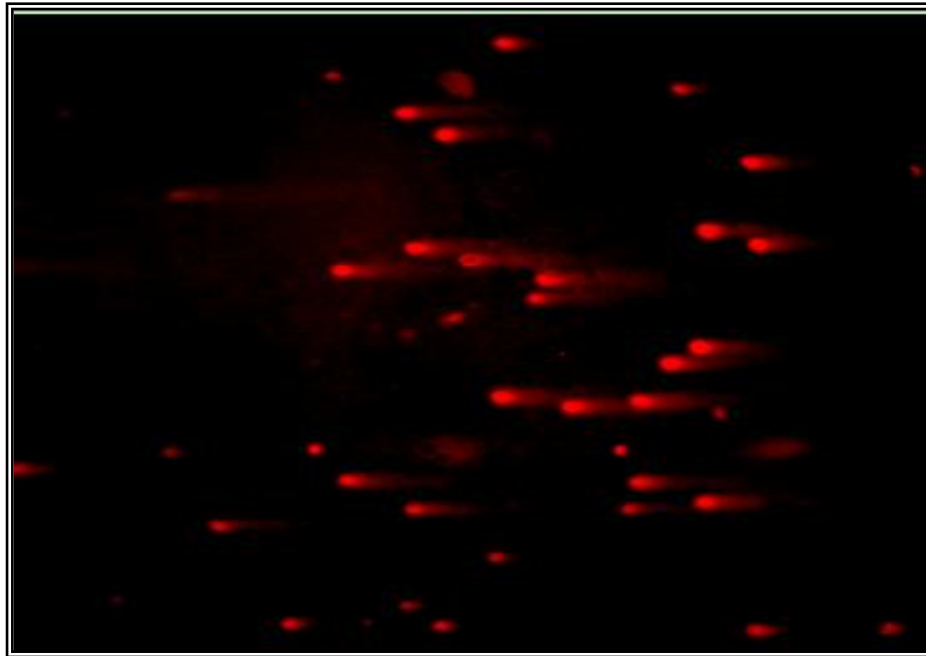


Figura 7. Aparência típica de uma lâmina de ensaio cometa (León, 2006).

Os ensaios que medem os rompimentos simples na cadeia requerem, geralmente, o desdobramento das duas fitas da molécula de DNA. Um alto pH (>12,3) é geralmente utilizado para facilitar a desnaturação, desdobramento e expressão dos rompimentos, assim como também as rupturas, que só se fazem aparentes depois da exposição a um álcali (lesões álcali lábil) (Liao *et al.*, 2009).

Atualmente, existem duas versões do ensaio cometa. A primeira, introduzida por Singh *et al.* (1988), utiliza eletroforese em condições alcalinas (pH>13) para analisar o dano no DNA, pode detectar rompimentos simples de cadeias de DNA e sítios álcali lábeis em células individuais. Dois anos depois do desenvolvimento do protocolo realizado pelo Singh et al., Olive introduziu outra versão alcalina deste ensaio, na qual as células são lisadas em uma álcali fraca (0,03 M NaOH) por 1h antes da eletroforese, e a eletroforese é realizada em um pH 12,3 (Liao *et al.*, 2009).

Ensaio Cometa versão alcalina (pH>13): várias versões do ensaio cometa são usadas na atualidade. Porém, a versão alcalina (pH > 13) deste ensaio é superior tanto pela avaliação de um amplo espectro de lesões no DNA como por maximizar a sensibilidade para a detecção de baixos níveis de dano, razão pela qual tem sido escolhida como uma ferramenta geral para avaliação do dano no DNA (Liao *et al.*, 2009). A versão alcalina pode ser usada para a detecção de rompimentos simples (SSB), sítios álcali lábeis (ALS) e, sob certas condições, entrecruzamentos do tipo DNA-proteínas ou DNA-DNA (Brendler – Schwaab *et al.*, 2005).

Devido ao fato de que quase todos os agentes genotóxicos induzem em ordens de magnitude mais SSB e/ou ALS que DSB, esta versão do ensaio apresenta um elevado incremento na sensibilidade para a identificação de agentes genotóxicos. Segundo o International Workshop on Genotoxicity Test Procedures (IWGTP) realizado em 1999 (Tice *et al.*, 2000), a melhor versão do ensaio cometa para identificar agentes com atividade genotóxica é a versão alcalina pH >13 do ensaio, desenvolvida por Singh *et al.*(1988).

Na versão original do ensaio, o DNA é desnaturado e desenovelado em um pH maior que 12,0 devido à ruptura das pontes de hidrogênio da cadeia dupla de DNA. Em condições de pH de 12,6 ou mais altas, os ALS são rapidamente transformados em quebras simples (Moller, 2006; Valverde & Rojas, 2009), isto é, em um pH maior que 13 é produzida a máxima expressão de ALS e SSB (Tice *et al.*, 2000). Em consequência, um incremento na migração do DNA está associada com um aumento nos níveis de SSB, associados com sítios de reparação pela excisão incompleta e ALS. Em contraste, e sob as mesmas condições, os entrecruzamentos podem estabilizar o DNA cromossomal e inibir sua migração. Uma redução da migração do DNA, em comparação ao controle negativo, pode indicar a indução de entrecruzamentos, lesões estreitamente relacionadas com os processos de mutagênese (Brendler-Schwaab *et al.*, 2005).

A pesar do fato de que as lesões detectadas por esta versão do ensaio são lesões primárias que podem ser reparadas de jeito eficiente, sem que resultem em alterações genéticas permanentes, também é certo que algumas delas como os SSB podem ser relevantes na formação de aberrações cromossômicas, da mesma forma que as modificações ao DNA, tais como os sítios abásicos (AP Sites), que podem ser importantes na indução de mutações genéticas (Brendler – Schwaab *et al.*, 2005).

2.3. Método PIXE

A técnica PIXE (emissão de raios-X induzidas por partículas) é uma técnica analítica baseada na emissão de raios-X característicos dos elementos presentes em uma amostra quando esta é irradiada por feixes de íons carregados (prótons, partícula alfa, etc). Essa técnica possibilita a identificação e quantificação simultânea de boa parte dos elementos da tabela periódica (do Na ao U em geral) com relativa rapidez (Johansson, 1995). Além disso, essa técnica é não destrutiva, ou seja, as amostras irradiadas pelo PIXE podem posteriormente ser analisadas por outras técnicas complementares. A sensibilidade dessa técnica é alta, embora isso dependa do tipo de amostra que está sendo investigado. O caso mais favorável para o PIXE é a determinação de elementos traço em matrizes de elementos leves, onde o limite de detecção é da ordem de 0,1-1 parte por milhão (ppm). Tipicamente, pode-se dizer que o limite de detecção do PIXE é da ordem de 1-10 ppm (Yoneama & Dias, 2004).

Princípios básicos: a técnica PIXE está baseada, como o próprio nome indica, na produção de raios-X induzidos pela passagem de um íon qualquer na vizinhança de um átomo constituinte do material em estudo. Um íon, ao atravessar um material qualquer, interage com os átomos desse material através de um potencial coulombiano, fazendo com que o íon perca sua energia, diminuindo assim sua velocidade. Nesse processo de interação íon-matéria, elétrons de camadas internas dos átomos do material podem ser emitidos, deixando uma vacância nessa camada particular. Neste caso, o átomo, como um todo, encontra-se em um estado excitado, com o excesso de energia correspondente à energia transferida pelo íon incidente.

Imediatamente, o átomo excitado procura reestabelecer seu estado natural através de um reordenamento de seus elétrons de suas diversas camadas. Em particular, elétrons de camadas mais externas poderão preencher as vacâncias deixadas por elétrons emitidos de camadas mais internas. Nesse processo de transição eletrônica entre camadas, pode haver a emissão de um raio-X do átomo em questão. Uma vez que a energia do raio-X emitido depende da diferença de energia das camadas eletrônicas envolvidas na transição, e levando-se em conta que essa energia é particular para cada elemento da tabela periódica, então esse raio-X é dito característico por representar, univocamente, um determinado elemento da tabela periódica.

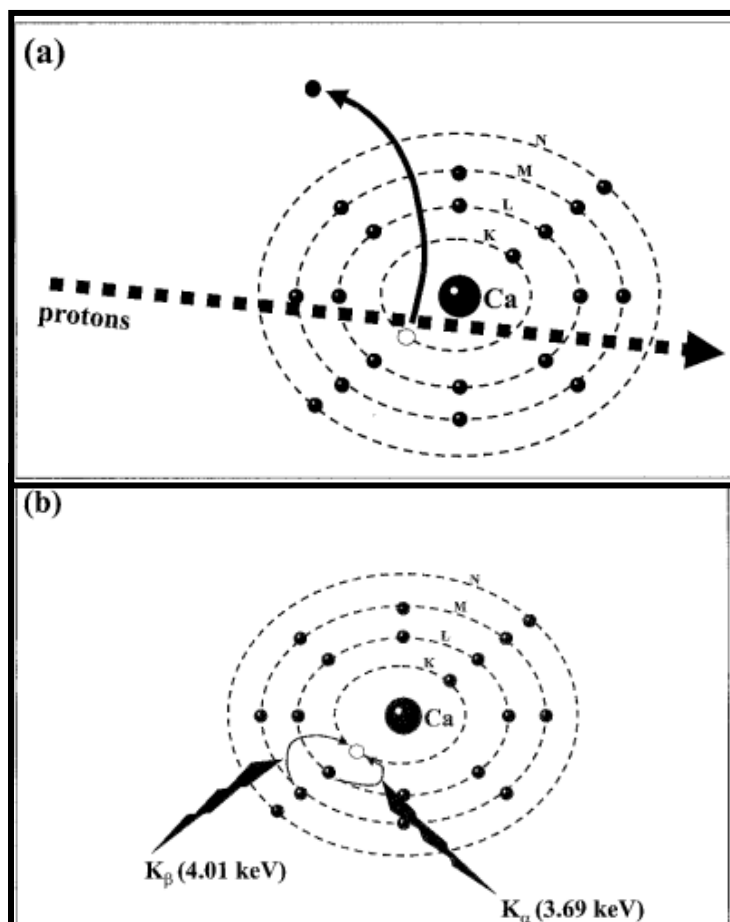


Figura 8. Princípio básico da técnica PIXE. Em (a) um feixe de prótons provoca a emissão de um elétron da camada K de um átomo de cálcio. Em (b) são mostrados dois possíveis modos de preenchimento da vacância deixada nessa camada, com os respectivos raios-X emitidos (Yoneama & Dias, 2004).

A figura 8 mostra esquematicamente o processo de emissão de raios-X característico de um átomo de cálcio. Os raios-X provenientes da transição de um elétron da camada L para a camada K são chamados de K- α , enquanto que transições da camada M para a K são chamados de K- β . Essa notação pode ser estendida para outras transições como, por exemplo, de uma camada M para uma camada L. Neste caso, o raio-X característico emitido é chamado de L- α . A detecção desses raios-X dão origem a um espectro onde os diversos elementos podem, em princípio, ser identificados através de sua energia, como é mostrado na figura 9 (Yoneama & Dias, 2004).

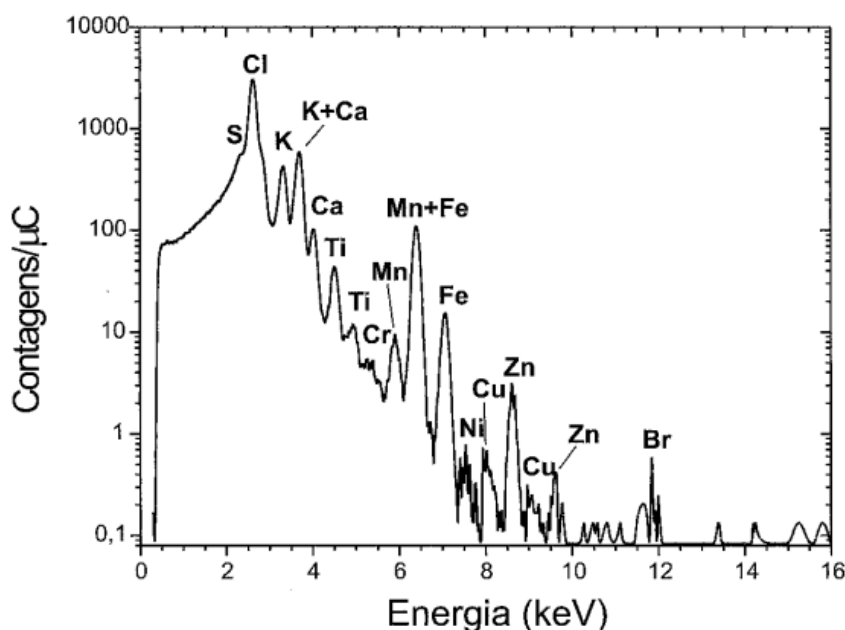


Figura 9. Espectro gerado a partir da análise de uma amostra (Yoneama & Dias, 2004).

Devido à sua versatilidade, a técnica PIXE vem sendo utilizada com sucesso em diversas áreas, principalmente na área de ciências ambientais, com grande destaque na análise de aerossóis. Atualmente, os laboratórios que realizam análise de materiais com feixes iônicos tendem a utilizar diferentes técnicas que sejam complementares entre si, como o PIXE, Retroespalhamento Rutherford (RBS), Análise de Átomos por Recuo Elástico (ERDA) ou Análise por Reações Nucleares (NRA) (Yoneama & Dias, 2004).

Este método tem sido uma técnica de comum escolha para realizar análise de elementos em estudos na área ambiental (Teixeira et al., 2004). Aplicações práticas incluem estudos de campo para a análise de partículas no ar, qualidade da água baseada em metais pesados e análise de elementos traços nas plantas cultivadas em solo regados com águas residuais (Solís et al., 2007). Também, a técnica é utilizada na análise de elementos traço de várias partes de plantas medicinais usadas no tratamento de diabetes mellitus (Naga Raju et al., 2006), para avaliar a localização celular e subcelular de metais traço em tecidos de plantas (Siegele et al., 2008), e tem sido aplicada com sucesso em estudos relacionados com as concentrações de proteínas (Follmer et al., 2002) e organismos eucariontes (Kern et al., 2004).

Resultados interessantes têm sido obtidos na avaliação do dano no DNA e na análise dos metais pesados relacionados com mineração de carvão em morcegos do Brasil (Zocche et al., 2010), e também na análise dos metais pesados em amostras da água de uma área de mineração na Mongólia (Bolormaa et al., 2006).

Precisão e acurácia do PIXE: Vários fatores podem influenciar, de uma maneira geral, na acurácia dos resultados obtidos pelo PIXE. Dentre eles podemos citar a preparação da amostra (grau de homogeneidade e suavidade), a natureza e homogeneidade dos padrões, a geometria definida pelos fatores feixe-amostra-detector, a medida da carga, a eficiência e a função resposta do detector, o ajuste do espectro, a correção dos efeitos de matriz e banco de dados.

Vale destacar que a precisão ou reprodutibilidade das medidas realizadas pelo PIXE podem ser afetadas pelos seguintes fatores: energia do feixe, posição das amostras, integração da corrente e a eficiência e ângulo sólido do detector. Portanto, a estabilidade desses parâmetros deve ser constantemente monitorada para garantir o mínimo de variabilidade nas medidas (Yoneama & Dias, 2004).

I. OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

1. Objetivo Geral

Avaliar os efeitos genotóxicos, citogenéticos e a presença de metais em uma população de trabalhadores exposta aos resíduos da mineração de carvão de Guajira-Colômbia.

2. Objetivos específicos

- ✓ Comparar os níveis de danos no DNA, mediante o ensaio cometa em linfócitos do sangue periférico, dos indivíduos expostos aos resíduos de mineração de carvão com os níveis de danos de uma população controle.
- ✓ Avaliar a frequência de alterações citogenéticas, pela técnica de micronúcleos em linfócitos e em células de mucosa oral, de indivíduos expostos a resíduos de mineração de carvão e comparar com os indivíduos controle.
- ✓ Avaliar os níveis de metais no sangue, utilizando o método PIXE, dos indivíduos expostos aos resíduos de mineração de carvão e os níveis dos indivíduos controle.
- ✓ Correlacionar as alterações citogenéticas, genotóxicas e os níveis de metais apresentados nos indivíduos expostos, dentro da cadeia de produção, com a idade e o tempo de exposição aos resíduos de mineração de carvão.
- ✓ Explorar a influência dos hábitos de vida dos indivíduos como efeitos sinérgicos de dano no DNA.

II. CAPITULO I

**ASSESSMENT OF DNA DAMAGE IN COAL OPEN-CAST MINING
WORKERS USING THE CYTOKINESIS-BLOCKED MICRONUCLEUS
TEST AND THE COMET ASSAY**

(Science of the Total Environment 15:409(4):686-691, 2011)

APRESENTAÇÃO CAPÍTULO I

O Capítulo I apresenta um trabalho que originou um manuscrito, o qual foi submetido à revista *Science of the Total Environment* em 31 Julho de 2010, intitulado “Assessment of DNA damage in coal open-cast mining workers using the cytokinesis-blocked micronucleus test and the comet assay” e publicado em janeiro de 2011.

Os resultados deste capítulo indicam que a exposição aos resíduos de mineração de carvão geram dano genético em trabalhadores expostos. Estes resultados são os primeiros dados de efeitos genotóxicos induzidos pela exposição a mineração de carvão na Colômbia, e contribuem para adoção de políticas de controle e prevenção do risco ocupacional destas populações.



Assessment of DNA damage in coal open-cast mining workers using the cytokinesis-blocked micronucleus test and the comet assay

Grethel León-Mejía ^{a,c}, Lyda Espitia-Pérez ^{a,c}, Luz Stella Hoyos-Girakdo ^b, Juliana Da Silva ^c, Andreas Hartmann ^d, João Antônio Pêgas Henriques ^{e,*}, Milton Quintana ^{a,*}

^a Laboratorio de Investigación Biomédica y Biología Molecular, Universidad del Sinú, Montería, Córdoba, Colombia

^b Department of Biology, Research Group Genet. Toxicology and Cytogenetics, Faculty of Natural Sciences and Education, Universidad de Cauca, Popayán, Cauca, Colombia

^c Laboratório de Genética Toxicológica (PPGGTA), Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), Canoas-RS, Brazil

^d Novartis Pharma AG, Basel, Switzerland

^e Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 July 2010

Received in revised form 28 October 2010

Accepted 28 October 2010

Keywords:

Coal mining

Genotoxicity

Comet assay

Micronucleus frequency

Occupational exposure

ABSTRACT

Coal mining is one of the most important causes of environmental pollution, as large quantities of coal dust particles are emitted. Colombia-South America has large natural coal reserves and “El Cerrejón” is the world’s largest open-cast mine located in the northern department of Guajira. The aim of the present study was to evaluate genotoxic effects in a population exposed to coal residues from the open-cast mine “El Cerrejón”. 100 exposed workers and 100 non-exposed control individuals were included in this study. The exposed group was divided according to different mining area activities: (i). Transport of extracted coal, (ii). Equipment field maintenance, (iii). Coal stripping and, (iv). Coal embarking. Blood samples were taken to investigate biomarkers of genotoxicity, specifically, primary DNA damage as damage index (DI), tail length and% of tail DNA using the Comet assay (alkaline version) and chromosome damage as micronucleus (MN) frequency in lymphocytes. Both biomarkers showed statistically significantly higher values in the exposed group compared to the non-exposed control group. No difference was observed between the exposed groups executing different mining activities. These results indicate that exposure to coal mining residues may result in an increased genotoxic exposure in coal mining workers. We did not find a correlation between age, alcohol consumption and service time with the biomarkers of genotoxicity. Our results are the first data of genotoxic effects induced by coal mining exposure in Colombia, and thus, contribute to the exploration of test batteries use for monitoring of exposed populations and may stimulate designing control, hygiene and prevention strategies for occupational health risk assessment in developing countries.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Coal is one of the most abundant minerals in nature and it constitutes the largest fossil fuel source used for the generation of energy. However, its extraction and use constitute an important pollution factor which represents a major threat for human health and natural populations (Chen et al., 2005; Zakrzewski, 1991). During coal extraction large quantities of particles of coal dust are emitted contributing to environmental pollution. In addition, due to the high

caloric power of this mineral, when it is exposed to ambient oxygen and sunlight a spontaneous combustion process may be initiated which liberates large amounts of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) into the environment. Coal residues consists of a mixture of substances, containing carbon, hydrogen, nitrogen, oxygen and sulfur (Chen et al., 2005), mineral particles of smaller size and inorganic compounds in the ashes (LUPME, 2005).

Colombia in South America has one of the world’s largest natural coal reserves in Latin America and “El Cerrejón” is the world’s biggest open-cast mine located in the northern department of Guajira (LUPME, 2005). The main operations carried out in this mine are: stripping (extraction of coal) and crushing (mining of coal for transporting). During the extraction processes in coal open-cast mining, particulate matters and combustion products are released into the atmosphere, where they constitute complex mixtures (Gibson, 1979). These mixtures are considered hazardous due to synergistic, additive and enhancing effects (DeMarini, 1991; Stephens and Ahern, 2001; White, 2002).

* Corresponding authors. Quintana is to be contacted at Laboratorio de Investigación Biomédica y Biología Molecular, Universidad del Sinú, Campus Elías Behnash Zalánin, Calle 38 Cra. 1W Barrio Juan XXIII, Montería, Córdoba, Colombia, South America. Tel./fax: +57 4 7841961. Henriques, Departamento de Biologia, Próbio 43422, Laboratório 210, Campus do Vale, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Bento Gonçalves 9500, Bairro Agronomia-CEP 91501-070, Porto Alegre, RS, Brazil. Tel.: +55 51 33186060; fax: +55 5133167003.

E-mail addresses: pogas@cbiot.ufgrs.br (J.A.P. Henriques), quintana@yahoocom (M. Quintana).

The predominant route of coal mining residues exposure is through inhalation. Today it is known that chronic inhalation of complex mixtures, containing substances such as heavy metals, ash, iron, PAHs and sulfur, can result in lung disorders including simple pneumoconiosis, progressive massive fibrosis, bronchitis, loss of lung function, emphysema and even cancer (Beckman and Ames, 1997; Schins and Borm, 1999). Recent studies have postulated that some of these diseases may be a consequence of inhaling such material resulting in activation of macrophages, interaction with epithelial cells and other cells, finally leading to generation of oxidative stress (Kamp et al., 1992). Besides direct cellular damage, compounds released by coal mining activities such as PAHs present an important mutagenic hazard that has been associated with an increased risk for cancer development (Mastrangelo et al., 1996). Despite these findings, coal dust remains classified as non carcinogen for human (Group 3) in International Agency for Research on Cancer (IARC, 1997).

Biomonitoring studies in peripheral lymphocytes of coal workers demonstrated increased adduct formation and increased of non-cellular and cellular sources of reactive oxygen species that can induce oxidative DNA damage (Schins et al., 1995; Schoket et al., 1999).

There are only a few studies on the occupational hazard effects in coal miners. However, some studies have been conducted in animals of mining regions. For example, cytotoxic and genotoxic effects of coal dust have been evaluated *in vivo* in wild rodents in coal mining areas in Brazil (Da Silva et al., 2000a,b) and in Colombia (León et al., 2007).

The aim of the present study was to evaluate potential genotoxic effects in peripheral blood lymphocytes in an exposed population to coal residues in the open-cast mine "El Cerrejón" in Guajira-Colombia using Comet assay and Micronucleus (MN) test. The results obtained from this study present the first data for Colombia on a genotoxic hazard generated by coal mining residuals exposure. In addition, our data represent an assessment of the feasibility of using tool biomarkers for evaluating potential occupational health risks. An area of application of such methods is to investigate whether it can be applied in coal mining activities in Colombia to support efforts for applying cleaner production procedures which would have less negative impacts on the environment and the human population.

2. Materials and methods

2.1. Individuals and sampling

The exposed individuals included in this study were workers from "El Cerrejón" open-cast coal mine, in Guajira Department in the north coast of Colombia, South America. A group of 100 exposed individuals engaged in surface activities of the sub-bituminous open-cast coal mine with a minimum time of service of 5 years were selected. The non-exposed control group consisted of 100 individuals, from Guajira department, with no known exposure to genotoxic agents including coal, radiation, chemicals or cigarettes. Both study populations (exposed and non-exposed group) lived in the same region considering that the two populations should have the same genetic background and the same life habits.

The exposed group was divided according to the engaged activities in the mine: (i) *Extracted coal transport* ($n=50$) in which the workers are involved in coal transport up to the arrival in the storing centers. (ii) *Equipment field maintenance* ($n=18$) these workers drive trucks to spread water in the roads where large quantities of coal dust are generated the workers also fix the coal extraction equipment. (iii) *Coal stripping* ($n=17$) these workers are engaged in coal stripping activities and the accumulation of the material for the transport in trucks, they also extinguish fires generated by coal spontaneous combustion. (iv) *Coal embarking* ($n=15$) these workers are involved in shipping of coal in containers to be exported to other countries.

Exposed workers were matched to non-exposed controls by age (± 2 years) and similar social-economic status. Confounding and exclusion factors were collected from all participants who responded to an interviewer-administered, detailed, standard questionnaire which included data of health status, cancer history, other chronic diseases, lifestyle, nutrition, smoking habits, medication intake, and frequency of alcohol consumption (total number of drinks and the most widely alcoholic beverages consumed), occupational and time of service, protective measures, and previous exposure to medical X-rays or treatment with known carcinogens. All individuals included into the study were non-smokers. The exposed group was selected according to the following inclusion approaches: voluntary acceptance, been healthy and time of service ≥ 5 years. Exclusion criteria for exposed and non-exposed groups were age over 60 years or less than 24 years, smoking (current and ex-smoking habits), medical treatment up to 3 months or X-ray up to 1 year before sampling and therapeutic drugs intake, known to be mutagenic. All data was organized and recorded in databases. There are no major differences regarding social-economic status or dietary habits were identified.

The whole study population was informed about the aim, benefits, risks and methodology details of the study through the informed consent, which was obtained from all individuals. We previously had the approval of the University of Simú Ethic Committee for this research study. All the information identifying the study individuals is kept at the "Laboratorio de Investigación Biomédica y Biología Molecular" of the University of Simú in the city of Montería, Córdoba department, which is the only institution having full identifiable information about the individuals.

2.2. Blood samples collection

After informed consent was obtained from each individual, peripheral blood samples from all 200 individuals were collected by venipuncture. 20 ml. of blood were drawn into heparin tubes (Becton Dickinson, vacutainer) for the Comet assay and MN test. All blood samples tubes were coded and kept in upright position at room temperature in dark during the transportation overnight to the laboratory, where the samples were processed immediately upon arrival.

2.3. Comet assay

The Comet assay in the present study was carried out according to the original methodology (alkaline version) described by Singh et al. (1988) and Singh and Pfeifer (1996) with slight modifications (Heuser et al., 2007; Da Silva et al., 2008). 30 μ l. of isolated lymphocytes by Histopaque 1077, were mixed with 270 μ l. 0.5% of low melting point (LMA-Invitrogen) at 37 °C. This mixture was placed into a slide previously coated with 1.5% of normal melting point agarose (NMA-Cambrex Bioscience Rockland) processed at 60 °C. The agarose layers were covered with a cover slip and after gel solidifying the cover slips were removed. The slides were immersed overnight in lysis solution (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA and 10 mM Tris, pH 10.0–10.5, 1% with freshly added 1% Triton X-100 and 10% DMSO) at 4 °C in dark. Afterwards, the slides were placed for 30 min in alkaline buffer at 4 °C (300 mM NaOH and 1 mM EDTA, pH > 13) to unwind the DNA. The alkaline electrophoresis was carried out for 30 min at 25 V and 300 mA. This standard alkaline procedure allows single-strand DNA breaks to be detected and alkali labile lesions (i.e., apurinic/apirimidinic sites) are converted to strand breaks under these conditions as well. The gels were neutralized with 0.4 M Tris (pH 7.5) with 3 washes of 5 min each. Finally, the slides were stained with 50 μ l. ethidium bromide (2 μ l./ml) and examined at 40 \times magnification under a fluorescence microscope equipped with a green filter of 540 nm. Direct light exposure of the samples was avoided during the whole process. For each individual we analyzed 100 randomly

selected Comets (50 cells from each of two replicate slides). For the analysis of the images we used a system image analysis software and the considered endpoints as measurement to quantify DNA damage, were tail length and % of tail DNA. In addition, the cells were classified according to tail size into five classes ranging from undamaged (0) to maximally damaged (4), obtaining a measure of the individual damage for each animal and consequently for each analyzed group. The damage index (DI) calculation was carried out according to the visual classification system (Collins et al., 1997). The values for the damage index could range from 0 (100 cells class 0) up to 400 (100 cells class 4). For the statistical analysis we took into account the mean values for all the Comet assay parameters.

2.4. Micronucleus test

The MN test using the cytokinesis-block technique was performed in this study (Fenech and Morley, 1985; Fenech, 1993; Heuser et al., 2007; Da Silva et al., 2008). This approach allows reliable data scoring because only the MN of those cells that have completed one nuclear division are analyzed. Cultures were prepared with whole blood in duplicate and processed as described by Albertini et al., 2000. Heparinized whole blood (0.5 mL) was added to 4.5 mL of RPMI 1640 medium (Sigma R8758, USA) supplemented with 2 mM L-glutamine (Sigma A5955, USA), 10% fetal bovine serum (Gibco/Invitrogen 15000-044, Brazil), 100 µL/mL antibiotic-antimycotic (Sigma A5955, USA) and 2% phytohemagglutinin (Sigma L8754, USA) to stimulate the lymphocytes. Cultures were incubated at 37 °C in dark for 46 h, under 5% CO₂ in a humidified atmosphere. Two parallel cultures were set in tubes (Falcon 3033) for each sample. Cytocalasin B (Sigma, C6762) was added at 44 h of incubation at a final concentration of 6 µg/mL. The cells were harvested at 72 h, treated with hypotonic solution (0.075 M KCl) immediately centrifuged and fixed three times with methanol/acetic acid (3:1). The fixed cells were dropped onto humidified slides and air dried. Slides were stained with Giemsa for 10 min. MN registration was performed on coded slides with double blind. Two thousand binucleated cells (BN) per individual (1000 BN per culture) were registered. All coded slides were analyzed with an optical light microscope (40× magnification). All slides were scored by one reader blinded to the exposure status of the individuals. The scoring criteria followed those proposed by Fenech et al., 2003.

2.5. Statistical analysis

The normality of the variables was evaluated using the Kolmogorov-Smirnov test; χ^2 and *t*-tests were used to compare the demographic characteristics of study populations. The statistical analysis of differences in MN test and DNA damage measured by Comet assay were carried out using the non-parametric Mann-Whitney *U*-test and statistical differences between the five groups (non-exposed control, extracted coal transport, equipment field maintenance, coal stripping, and coal embarking) were analyzed using the non-parametric two-tailed Kruskal-Wallis test with the Dunn correction for multiple comparisons to perform a non-parametric analysis of variances. Correlations between different variables were determined by Spearman rank correlation test as appropriate. The critical level for rejection of the null hypothesis was considered to be *p* value of 5%. All analyses were performed with the PRISMA 5.0 statistical software package.

3. Results

The main demographic characteristics of the study population are shown in Table 1. The mean age of exposed group was 44.0 ± 7.5 years (range, 24–60 years), and non-exposed control group was 43.7 ± 7.8 years (range, 27–60 years). The mean time of service ± standard

Table 1
Main demographic characteristics of the studied population: non-exposed control and exposed groups.

Demographic characteristics	Groups	
	Non-exposed control	Exposed
Number of individuals	100	100
Age (mean ± SD)	43.7 ± 7.8	44.0 ± 7.5
Time of service (Mean years ± SD)	-	17.7 ± 6.9
Alcohol consumption		
Non-alcohol consumers	55 (55%)	45 (45%)
Alcohol consumers*	45 (45%)	55 (55%)

SD = Standard deviation.

* Drink more than three beers/day or drink in excess of once a week.

deviation (SD) of the exposed group was 17.7 ± 6.9 years (range, 5–30 years).

Table 1 shows the percentage of alcohol consumption for non-exposed group (45%) and exposed group (55%), considered as alcohol consumer that drink more than three beers per day or drink in excess of once a week.

Table 2 summarizes the Comet assay data and Micronucleus frequency values for both study groups. The mean values of both biomarkers parameters in the exposed group demonstrated significant differences when compared to the values of the non-exposed control group (*p* < 0.001), which were analyzed using Kruskal-Wallis test (Dunn correction). There was no statistically significant difference between the four different coal mining activities (*p* > 0.05).

The results obtained in Micronucleus frequency show that the values in the exposed to coal mining residuals group (8.6 ± 4.8) are higher compared with the non-exposed control group (2.9 ± 4.0). The differences were significant as is shown in Table 2, evaluated through Mann-Whitney *U*-test (*p* < 0.001). Table 2 shows the mean values of the Comet assay parameters of the two study groups. This comparison, for each Comet assay parameter damage index, tail length and % of tail DNA, clearly demonstrates higher levels of DNA damage in the exposed group (mean tail length = 23.4 ± 6.5; mean % of tail DNA = 13.1 ± 7.9; mean DI = 60.0 ± 39.5) compared to the non-exposed control group (mean tail length = 14.3 ± 2.5; mean % of tail DNA = 2.9 ± 1.5; mean DI = 9.0 ± 6.4). These differences were all statistically significant evaluated using Mann-Whitney *U*-test (*p* < 0.001).

The Spearman correlation coefficients for MN frequency with age, and DNA damage (tail length, % of tail DNA, DI) for non-exposed control and exposed groups were not significant (*p* > 0.05). The correlations between MN frequency with time of service, and DNA damage (tail length, % of tail DNA and DI) for the subdivided exposed groups, were not significant (*p* > 0.05). We analyzed the effect of alcohol consumption on MN frequencies and DNA damage in all groups using Mann-Whitney *U*-test and found no difference in any of the groups (*p* > 0.05).

4. Discussion

Occupational exposure to coal residues is a public health concern in developing countries owing to the lack of regulation policies and epidemiologic surveillance programs and to the limited coal combustion residues and particulate matter emission management (Popovic et al., 2001; Baba and Kaya, 2004). During coal open-cast mining extraction processes significant amounts of these substances are released to the atmosphere where they constitute complex mixtures (Gibson, 1979). The main route of exposure to these particulate matters is through inhalation. Most of the published studies have focused on underground coal workers (Knudsen et al., 2005; Donbak et al., 2005) and only a few studies like Sram et al. (1985) have evaluated induction of chromosome aberrations by coal complex

Table 2

Comet assay and Micronucleus test parameters in non-exposed control and Exposed group divided by work areas activities (mean \pm standard deviation).

Parameters	Non-exposed control group (n=100)	Whole exposed group (n=100)	Exposed group/work areas activities			
			Extracted coal transport (n=50)	Equipment field maintenance (n=18)	Coal stripping (n=17)	Coal embarking (n=15)
Comet assay (100 lymphocytes/individual)						
Tail length	14.3 \pm 2.5	23.4 \pm 6.5*	22.9 \pm 7.1*	23.6 \pm 6.0*	25.1 \pm 7.1*	22.2 \pm 3.7*
% of Tail DNA	2.9 \pm 1.5	13.1 \pm 7.9*	12.0 \pm 7.9*	13.5 \pm 7.7*	16.5 \pm 9.4*	11.8 \pm 6.1*
Damage index (index range=0–400)	9.0 \pm 6.4	60.0 \pm 30.5*	55.9 \pm 40.1*	62.7 \pm 38.2*	74.0 \pm 45.9*	53.8 \pm 31.0*
Micronucleus test frequency (2000 binucleated cells/individual)	2.9 \pm 4.0	8.6 \pm 4.8*	7.9 \pm 4.2*	8.6 \pm 5.0*	8.5 \pm 4.7*	11.0 \pm 5.8*

* Significant difference in relation to the non-exposed control group; Kruskal–Wallis–Dunn correction $p < 0.001$.

mixtures in open-cast mining workers. Colombia possesses the largest coal reserves in Latin America (UPME, 2005); however, to date, genotoxic endpoints related to coal open-cast extraction has only been evaluated in rodent populations (León et al., 2007).

In the present study we investigated potential genotoxic effects of coal exposure in mining workers. Biological monitoring of exposure to chemical substances in the workplace is crucial to assess potential human health risks, as an integral strategy to improve occupational health, safety conditions and life quality in developing countries. We applied the Comet assay to compare the extent of primary DNA damage and the Micronucleus test as cytogenetic effect biomarker in peripheral blood lymphocytes from exposed and non-exposed individuals.

Our results demonstrate that the group exposed to coal mining residuals exhibited a significantly higher extent of DNA damage in peripheral lymphocytes in the Comet assay and MN test compared to the control group. Previous studies with underground coal mine workers have demonstrated higher levels of chromosomal damage, evaluated through chromosomal aberration, MN and sister chromatid exchange assays (Donbak et al., 2005; Sram et al., 1985; Santa María et al., 2007; Agostini et al., 1996). There are no significant differences in DNA damage average (Comet assay and MN test) of control group were detected between this study and previous studies of our group (Heuser et al., 2007; Da Silva et al., 2008).

It is known that coal mining activities release significant quantities of fugitive particles and toxic gases as sulfur dioxide into the environment (UPME, 2005). Some quality parameters of coal from the open-cast mine "El Cerrejón" are total moisture (~10%), volatiles (~30%), ash (~8%), sulfur (~1%), carbon (~70%), hydrogen (~6%), oxygen (~5%), nitrogen (~1%), as well as different metals (ETSU & Department of Trade and Industry, 2000). Chronic exposure to this coal complex mixture release into the atmosphere (Gibson, 1979) constitute one of the most important occupational health and safety risks of workers due to the potential synergistic toxic effects of this compound mixture (White, 2002; DeMarini, 1991). Considerable data has suggested that reactive oxygen species (ROS) and their products are involved in the pathogenesis of lung disorders and cancer risk (Schirs et al., 1995; Cooke et al., 2003; Beckman and Ames, 1997) in exposed workers. The primary target cells of inhaled coal dust particles are macrophages and epithelial cells. Activated macrophages (phagocytosis toxicity) produce excessive amounts of ROS and cytokines. ROS may additionally be generated via cell-independent mechanisms due to intrinsic chemical properties of the coal dust (e.g. surface radicals and iron). Epithelial cells and fibroblasts which are the main producers of components of the extracellular matrix including collagens, proteoglycans and elastic fibres, are also known to produce cytokines and ROS upon stimulation. Additional phagocytotic cells (neutrophils, monocytes/macrophages) may be recruited by chemokines produced by the alveolar macrophages as well as epithelial cells, and may amplify local production of ROS and cytokines. Both ROS and cytokines may cause damage or proliferation of local epithelial and mesenchymal tissue and may as such have consequences to lung tissue morphology, cell turnover and deposition of extracellular

matrix components. The formation and degradation of extracellular matrix may also be affected by ROS, as well as proteases and antiproteases produced by the various cell types present in the surrounding tissue (Schirs and Borm, 1999). When there is excessive production of ROS, or when there are insufficient *in vivo* defense mechanisms, oxidative stress may occur. This stress may result in DNA damage, lipid peroxidation, protein modification, membrane disruption, and mitochondrial damage (Zhai et al., 2002), all modifications capable of affecting cytogenetic damage levels.

Other components associated to heavy metals toxicity such as Copper, Lead, Cadmium, Nickel, Vanadium and Zinc appear in high concentrations in coal complex mixture (ATSDR, 1993). Large amounts of mutagenic compounds such as PAHs are produced during the spontaneous coal combustions which is a common process in coal storing centers due to environmental factors as sunlight and climate conditions. Some PAHs related to coal mining such as chrysene and benzo(k)fluoranthene are indicators of coal combustion, and pyrene and fluoranthene are associated with such processes (Sai, 1995). PAHs can induce DNA lesions as single-strand breaks via DNA repair mechanisms (Pavanello et al., 2005; Rojas et al., 2000; Brescia et al., 1999) and electrophilic metabolites that covalently interact with the DNA (Pereira-Netto et al., 2000; Singh et al., 2007) forming adducts with purines, especially with guanine after metabolic activation by enzymatic complex P450 (Baird et al., 2005).

Due to the complex mixture in occupational coal mining environments it is difficult to relate genotoxic effects to a specific agent or compound. The Comet assay is particularly sensitive towards the detection of direct and indirect DNA strand breakage and DNA alkaline-labile sites. These types of DNA damages are usually induced by most of the genotoxic agents which induce DNA breaks at the phosphodiester skeleton or between bases and sugars resulting in abasic sites (Tice et al., 2000). The MN assay in peripheral blood lymphocytes is extensively used in biomonitoring and molecular epidemiology studies to evaluate the presence and the extent of chromosomal damage in exposed human populations to genotoxic agents, and also because an increased MN frequency has been validated as a cancer risk biomarker in humans (Fenech, 1999; Bonassi et al., 2007).

In our study no significant difference in markers of genotoxicity between the four coal mine activities (extracted coal transport, equipment field maintenance, coal stripping and coal embarking) was observed. These observations indicate that exposed workers have a comparable genotoxic response to complex mixture exposure independently to the area and activity in the mine. In addition to these findings, there was no correlation between the time of service and Comet assay parameters or MN frequency. This observation is in agreement with the results obtained in other occupational settings studies (Sailaja et al., 2006; Gomez-Arroyo et al., 2000).

In our results, there was no influence of alcohol consumption, age or time of service in the exposed individuals on Comet assay parameters tail length, % of tail DNA and damage index or the MN frequency (Celik et al., 2007; Shaham et al., 2002; Pinto et al., 2000). The results obtained with respect the alcohol consumption are in

agreement with other occupational studies in which there was no association between the alcohol consumption and the levels of DNA damage observed (Rajah and Ahuja, 1995; Martínez-Valenzuela et al., 2009; Sailaja and Satyaprasad, 2006).

In conclusion, while we did not specifically verify the underlying mechanisms of the genotoxic effects observed in our study, DNA damage in the exposed mining workers may be a consequence of oxidative damage resulting from coal residue mixtures containing traces of iron, sulfur, coal ash, heavy metals and PAHs. Our results are the first data for the genotoxic damage induced by coal mining exposure for Colombia and contribute to the assessment of the usefulness of such biomarkers. Our results may motivate towards the use of biomarkers to monitor hygiene and prevention strategies in occupational settings in developing countries.

Acknowledgments

This study was supported by COLCIENCIAS 1283-408-20487/2008 and by Vicerrectoría de Investigaciones Universidad del Sinú and Universidad del Cauca, Colombia. We are grateful with Jaime Luna, Shirley Salcedo, Ingrid Reyes, Jorge Galeano, Luisa Fernanda Escobar-Hoyos, Dra. Temenouga Guecheva, Nubia Yandar, Victoria Jaramillo, Hugo Brango and Paula Rohr for their invaluable help. We thank the help of SINTRACARBON – “El Cerrejón” study population and to the non-exposed controls for their great disposition during the sampling.

References

Agostini J, Otto P, Wajant A. Chromosome damage in underground coal mines: detection by conventional cytogenetic techniques and by submitting lymphocytes of unexposed individuals to plasma from at-risk groups. *Braz J Genet* 1996;19: 641–6.

Albertini RJ, Anderson D, Douglas GR, Hagmar L, Hemminki K, Merlo F, et al. IARC guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *Int Program Chem Saf Mutat Res* 2000;463:111–72.

ATSDR. Agency for toxic substances and disease registry-ToxFAQs Toxicological profile for: Lead, Cadmium, Nickel, Vanadium and Zinc. University of Utah; 1993. Available on line. <http://www.watsdr.cdc.gov/toxfaqs.html>.

Babi A, Kaya A. Leaching characteristics of solid wastes from thermal power plants of western Turkey and comparison of toxicity methodologies. *J Environ Manage* 2004;73:199–207.

Baird WM, Hooven LA, Mahadevan B. Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action. *Environ Mol Mutagenesis* 2005;45:1108–14.

Beckman KB, Ames BN. Oxidative decay of DNA. *J Biol Chem* 1997;272:19633–6.

Bonassi S, Znaor A, Ceppi M, Lando C, Chang WP, Holand N, et al. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis* 2007;28:625–31.

Brescia G, Colotti L, Ciofano E, Neumann HG, Forni A, Foll V, et al. The influence of cytochrome P450 1A1 and glutathione S-transferase M1 genotypes on biomarker levels in coke-oven workers. *Arch Toxicol* 1999;73:431–9.

Colik M, Donbak L, Unal F, Yuzbaoglu D, Aloyo H, Yilmaz S. Cytogenetic damage in workers from a coal-fired power plant. *Mutat Res* 2007;627:158–63.

Chen Y, Shah N, Huggins FE, Huffman GP. Transmission electron microscopy investigation of ultrafine coal fly ash particles. *Environ Sci Technol* 2005;39: 1144–51.

Collins AR, Dolson VL, Dusinska M, Kennedy G, Steina R. The comet assay: what can it really tell us? *Mutat Res* 1997;375:183–93.

Cooke MS, Evans MD, DiLuzio M, Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutagenesis, and disease. *FASEB J* 2003;17:1195–214.

Da Silva J, de Freitas T, Heuser V, Maranhão J, Bitencourt F, Ceski C, et al. Effects of chronic exposure to coal in wild rodents (*Chromomys torquatus*) evaluated by multiple methods and tissues. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 2000a;470:39–51.

Da Silva J, de Freitas T, Heuser V, Maranhão J, Endtman B. Genotoxicity monitoring in coal regions using wild rodent *Chromomys torquatus* by comet assay and micronucleus test. *Environ Mol Mutagen* 2000b;35:270–8.

Da Silva J, Moraes CR, Heuser VD, Andrade VM, Silva FR, Kvitko K, et al. Evaluation of genetic damage in a Brazilian population occupationally exposed to pesticides and its correlation with polymorphisms in metabolizing genes. *Mutagenesis* 2008;23: 415–22.

DeMeini D. Environmental mutagens/complex mixtures. *Genet Toxicol* 1991;285–302.

Donbak L, Rencuzogulleri E, Yavuz A, Topakci M. The genotoxic risk of underground coal mines from Turkey. *Mutat Res* 2005;588:82–7.

ETSU & Department of Trade and Industry. The fate of trace elements in PF combustion systems. Report No. COAL R193 - DTI/Pub URN 00/947077. <http://www.barc.gov.uk/nationalarchives.gov.uk/k/nac/+http://www.dti.gov.uk/files/01r18560.pdf>; 2000.

Fenech M. The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutat Res* 1998;285:35–44.

Fenech M. Micronucleus frequency in human lymphocytes is related to plasma vitamin B12 and homocysteine. *Mutat Res* 1999;428:299–304.

Fenech M, Morley AA. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat Res* 1985;147:29–36.

Fenech M, Bonassi S, Turner J, Lando C, Ceppi M, Chang WP, et al. Intra- and inter-laboratory variation in the scoring of micronuclei and nucleoplasmic bridges in binucleated human lymphocytes: results of an international slide-reading exercise by the HUMN project. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 2003;534:45–64.

Gibson J. Coal – an introduction to its formation and properties. In: Pitt GJ, Millward GR, editors. *Coal and Modern Coal Processing: An Introduction*. Academic Press; 1979. p. 1–25.

Gomez-Arroyo S, Diaz-Sanchez Y, Meneses-Perez MA, Villalobos-Pietini R, De Leon-Rodriguez J. Cytogenetic biomonitoring in a Mexican floriculture worker group exposed to pesticides. *Mutat Res* 2000;466:117–24.

Heuser VD, Endtman B, Kvitko K, Rohr P, de Silva J. Evaluation of genetic damage in Brazilian footwear-workers: biomarkers of exposure, effect, and susceptibility. *Toxicology* 2007;232:235–47.

IARC. International Agency for Research on Cancer. Agents Classified by the IARC Monographs, Volumes 1–100. *Gas N° 000050-41-0*. 1997; 68.

Kamp DW, Gaccella P, Pryor WA, Weitzman SA. The role of free radicals in asbestos-induced diseases. *Free Radic Biol Med* 1992;12:293–315.

Krudsen LE, Gaskell M, Martin EA, Poole J, Schoepers PF, Jansen A, et al. Genotoxic damage in mine workers exposed to diesel exhaust, and the effects of glutathione transferase genotypes. *Mutat Res* 2005;583:120–32.

León G, Pérez LE, Linares JC, Hartmann A, Quintana M. Genotoxic effects in wild rodents (*Rattus rattus* and *Mus musculus*) in an open coal mining area. *Mutat Res* 2007;630: 42–9.

Martínez-Valenzuela C, Gómez-Arroyo S, Villalobos-Pietini R, Waliszewski S, Calderón-Segura ME, Félix-Gastelum R, et al. Genotoxic biomonitoring of agricultural workers exposed to pesticides in the north of Sinaloa State, Mexico. *Environ Int* 2009;35:1155–9.

Mestraglio G, Fedla E, Mamma V. Polycyclic aromatic hydrocarbons and cancer in man. *Environ Health Perspect* 1996;104:1166–70.

Pavanello S, Pullito A, Skwirska E, Milewska D, Clonfero E. Reduced nucleotide excision repair and GSTM1-null genotypes influence anti-B[a]P-DNA adduct levels in mononuclear white blood cells of highly PAH-exposed coke oven workers. *Carcinogenesis* 2005;26:160–75.

Pereira-Netto AD, Moraes JC, Dias AEXO, Artila G, Ferreira LPV, Oliveira AS, Bank J. Avaliação da Contaminação Humana por Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAS) e seus Derivados Nitrosados (NHPAS): Uma Revisão Metodológica. *Quim Nova* 2000;23:765–73.

Pinto D, Gballe JM, Garcia G, Guzman P, Del Razo LM, Vera E, et al. Increased cytogenetic damage in outdoor painters. *Mutat Res* 2000;467:105–11.

Popovic A, Djordjevic D, Polić P. Trace and major element pollution originating from coal ash suspension and transport processes. *Environ Int* 2001;26:251–5.

Rajah T, Ahuja YK. In vivo genotoxic effects of smoking and occupational lead exposure in printing press workers. *Toxicol Lett* 1995;76:71–5.

Rojas M, Castañeda I, Alexandrov K, Kisek E, Aulbutin G, Meyer L, et al. Modulation of benzo[a]pyrene diol-epoxide-DNA adduct levels in human white blood cells by CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 polymorphisms. *Carcinogenesis* 2000;21:35–41.

Sai XC. The pollution of PAH. *Environ Protot* 1995;10:31–3.

Sailaja KK, Satyaprasad K. Degradation of glyphosate in soil and its effect on fungal population. *J Environ Sci Eng* 2006;48:189–90.

Sailaja N, Chandrasekhar M, Reddavevi PV, Malhotra M, Rahman MF, Vuyyuri SB, et al. Genotoxic evaluation of workers employed in pesticide production. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 2006;609:74–80.

Santa María SR, Asena M, Ramírez O. Chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes from male native miners working in the Peruvian Andes. *Genet Mol Biol* 2007;30:1135–8.

Schins RP, Borm PJ. Mechanisms and mediators in coal dust induced toxicity: a review. *Ann Occup Hyg* 1999;43:7–33.

Schins RP, Schilderman PA, Borm PJ. Oxidative DNA damage in peripheral blood lymphocytes of coal workers. *Int Arch Occup Environ Health* 1998;67:153–7.

Scholet R, Poirier M, Meyer G, Török G, Kolzani-Ringelmann Á, Bogdan G, et al. Biomonitoring of human genotoxicity induced by complex occupational exposures. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 1999;445:193–203.

Shaham J, Gurvich R, Kaufman Z. Sister chromatid exchange in pathology staff occupationally exposed to formaldehyde. *Mutat Res* 2002;514:115–23.

Singh NP, Pfeifer GP. Microgel electrophoresis of DNA from individual cells: Principles and Methodology. Technologies for Detection of DNA Damage and Mutations. New York: Plenum Press; 1996. p. 3–24.

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 1988;175:184–91.

Singh R, Soem RJ, Binkova B, Kalina I, Popov TA, Georgieva T, et al. The relationship between biomarkers of oxidative DNA damage, polycyclic aromatic hydrocarbon DNA adducts, antioxidant status and genetic susceptibility following exposure to environmental air pollution in humans. *Mutat Res Fundam Mol Mech Mutagen* 2007;620:83–92.

Soem RJ, Hala N, Kotesovec F, Vavra R. Chromosomal abnormalities in soft coal open-pit mining workers. *Mutat Res* 1985;144:271–5.

Stephens C, Allen M. Worker and Community health impacts related to mining operations internationally: a rapid review of the literature. *Mining, Minerals and Sustainable*

- Development Project (MMSD). Institute for Environment and Development (IED), World Business Council, for Sustainable Development (WBCSD); 2001. p. 90.
- Tice RR, Agostoni E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Ichihashi H, et al. Single cell gel/mutet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 2000;35:206–21.
- UPME. Plan de exposición de referencia de generación-trasmisión (Versión preliminar). In: www.upme.gov.co/ed/ot. Vol. 2010; 2005.
- White P. The genotoxicity of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in complex mixtures. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 2002;515:85–98.
- Zakrewski S. Principles of environmental toxicology. Washington, DC: ACS; 1991.
- Zhai R, Liu G, Ge X, Yang C, Huang C, Wu C, et al. Genetic polymorphisms of MnSOD, GSTM1, GSTT1, and OGG1 in coal workers' pneumoconiosis. *J Occup Environ Med* 2002;44:372–7.

IV. CAPÍTULO II

APRESENTAÇÃO CAPÍTULO II

Os resultados deste capítulo não foram inseridos no Capítulo I desta dissertação, mas são importantes para a discussão do tema abordado nesse trabalho.

Nesse capítulo, foram avaliados os efeitos citogenéticos em células epiteliais da mucosa oral e foram avaliados os metais presentes no sangue da população de trabalhadores de mineração de carvão de Guajira-Colômbia. Nos resultados foi observado que a frequência dos micronúcleos no grupo exposto aos resíduos de mineração de carvão é significativamente maior do que o grupo controle, e foram encontradas quantidades significativamente maiores de Si e Al no grupo exposto, metais que estão relacionados com a mineração do carvão.

1. MATERIAIS E MÉTODOS

1.1. Indivíduos: foram incluídos no estudo 100 trabalhadores expostos a resíduos de mineração de carvão e 100 indivíduos controle. O método utilizado para a inclusão dos indivíduos pertencentes a este estudo está descrito no Capítulo 1.

1.2. Amostras de sangue: parte das amostras de sangue coletadas para o trabalho descrito no Capítulo 1 foram usadas para a avaliação pelo método PIXE.

1.3. Coleta das amostras da mucosa oral: os doadores da amostra de mucosa oral fizeram enxaguamento bucal com água antes da amostra ser coletada. As amostras de mucosa oral foram obtidas mediante uma raspagem na parte interna das bochechas. Todas as amostras, tanto as de sangue como as de mucosa oral, foram codificadas e transportadas a temperatura ambiente até o laboratório.

1.4. Teste de Micronúcleos em mucosa oral

Foram coletadas amostras de mucosa oral mediante raspagem, com o auxílio de uma escova para coleta de tecido cervical, no lado direito e esquerdo da cavidade bucal de cada indivíduo e condicionadas em tubos para centrifugação tipo *falcon* com 40 mL de solução tampão fosfato, pH 6,8. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 1.000 rpm e o sedimento obtido (0,5 mL) recebeu 8 mL de ácido acético e metanol 3:1, processo realizado por mais duas vezes para obtenção de 0,3 mL de solução final. Após, o sedimento foi fixado em uma lâmina, e estas foram reservadas por um período correspondente a uma noite. As lâminas foram submersas em HCl (1 N), coradas com uma mistura de 70 mL de Giemsa e 30 mL de tampão fosfato (pH 5,8) por 5 minutos, e secas a temperatura ambiente. As lâminas coradas foram avaliadas por microscopia óptica e a contagem celular foi realizada às cegas em 1.000 células por lâmina em replicata para cada indivíduo, seguindo recomendações de Thomas *et al.* (2009).

1.5. Método PIXE

O conteúdo de metais nas amostras de sangue foi analisado mediante a técnica de emissão de raios-X induzidos por partículas (PIXE) (Johansson et al., 1995), por sua alta sensibilidade, simplicidade e a capacidade para detectar múltiplos elementos simultaneamente. As amostras do sangue foram secas a 40°C por 72 horas, depois maceradas até um pó fino. Estas amostras foram homogeneizadas e submetidas à pressão até formar pastilhas de 3 mm de espessura, os quais foram posicionados no alvo da câmara de reação. A pressão dentro desta câmara foi de cerca de 10 mbar. As medidas foram feitas no acelerador Tandetrom do Laboratório de Implantação Iônica do Instituto de Física da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Este acelerador possui uma tensão terminal de + 3 MV, gerando um feixe de prótons de 2,0 MeV, com uma corrente média de 5 nA sob o alvo. Para detecção, foi utilizado um detector de raios X Si(Li), que compreende a faixa de energia de 1 keV a 16 keV, com uma resolução de 155 eV em 5,9 keV. A análise quantitativa dos dados foi realizada utilizando o programa GUPIXWIN (Maxwell et al., 1989, 1995; Campbell et al., 2000). Para essa análise foi usado como padrão o fígado bovino (NIST SRM1577b).

1.6. Análise estatística

Inicialmente, foi avaliada a normalidade das variáveis usando o teste Kolmogorov-Smirnov, e a seguir os testes χ^2 e Teste *t*-Student para comparar as características demográficas da população de estudo. Para analisar as diferenças estatísticas da frequência de MN, foi usado o teste não-paramétrico Mann-Whitney *U*-test e as diferenças estatísticas entre os cinco grupos de trabalho (grupo controle, transporte do carvão extraído, manutenção do equipamento em campo, mineração de carvão, embarque do carvão) foram analisadas pelo teste não-paramétrico Kruskal-Wallis, e correção de Dunn para comparações múltiplas para a análise não-

paramétrica das variâncias. As correlações entre as diferentes variáveis foram determinadas mediante a correlação de Spearman. Como nível crítico de rejeição da hipótese nula foi considerado p value de 5%. Para a comparação das concentrações de elementos químicos analisados mediante PIXE foi usado o teste Fisher F, o teste T de Student e a correção de Welch com um grau de significância de 5%. Todas as análises foram feitas usando o software estatístico PRISMA 5.0.

2. RESULTADOS

2.1. MUCOSA ORAL

Com respeito às principais características demográficas da população em estudo, a idade média do grupo exposto foi $44,0 \pm 7,5$ anos (faixa de 24–60 anos), e no grupo controle foi $43,7 \pm 7,8$ anos (faixa de 27–60 anos). A média do tempo de serviço \pm desvio padrão (SD) do grupo exposto foi $17,7 \pm 6,9$ anos (faixa de 5–30 anos).

A porcentagem do consumo de álcool para o grupo controle foi de 45% e para o grupo exposto foi de 55%, considerando como consumidor de álcool quem bebeu mais de três cervejas por dia ou tomou em excesso uma vez na semana.

A Figura 1 resume os valores da frequência de micronúcleos para ambos os grupos de estudo controles e expostos divididos por áreas de trabalho. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as diferentes atividades de mineração de carvão ($p > 0,05$) porém as médias de micronúcleos observadas para todos os grupos expostos à mineração de carvão foram significativamente maiores quando comparadas aos valores do grupo controle ($p < 0,001$; Kruskal-Wallis-Dunn correction).

Os resultados obtidos na frequência de micronúcleos na mucosa oral mostram que os valores no grupo exposto aos resíduos de mineração de carvão ($8,8 \pm 12,8$) são

significativamente mais altos quando comparados com o grupo controle ($1,0 \pm 2,2$), os quais foram avaliados mediante teste *U-Mann Whitney* ($p < 0,001$) (Tabela 3). Além disso, na Tabela 1 são mostrados diferentes biomarcadores relacionados com anomalias nucleares na mucosa oral: biomarcador de amplificação gênica e instabilidade cromossomal (nuclear buds ou “broken egg”) e de morte celular (cariorrética e cariólise). As médias no grupo exposto para estes biomarcadores foram significativas quando comparadas com o grupo controle ($p < 0,05$).

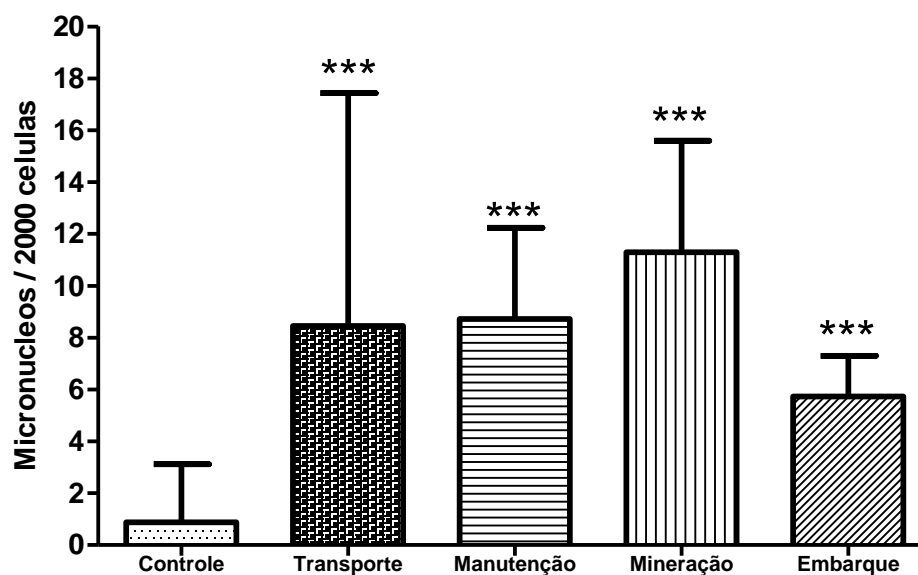


Figura 1. Número de micronúcleos observados nas células dos indivíduos do grupo controle e do grupo exposto dividido por atividades nas áreas de trabalho (média ± desvio padrão). *Diferença significativa em relação ao grupo controle, $p < 0,001$; Kruskal Wallis-Dunn correction.**

O coeficiente de correlação de Spearman da frequência dos micronúcleos com respeito à idade para o grupo exposto e para o grupo controle não foi significativo ($p > 0,05$). A correlação entre a frequência de micronúcleos e o tempo de serviço para os grupos expostos subdivididos não foi significativa ($p > 0,05$). Foi analisado também o efeito do consumo de álcool sob a frequência de micronúcleos em todos os grupos usando Mann Whitney *U*-test e não foi achada diferença significativa ($p > 0,05$).

Tabela 1. Parâmetros de dano ao DNA (micronúcleos), de amplificação gênica (BUD) e de morte celular (cariorrética e cariólise) nos indivíduos expostos e não expostos (média \pm desvio padrão).

Tipos Celulares	Grupos	
	Controles	Expostos
Micronúcleos	1,0 \pm 2,2	8,8 \pm 12,8*
BUD	1,0 \pm 1,1	2,7 \pm 4,2*
Cariorrética	35,8 \pm 30,5	64,8 \pm 54,9*
Cariólise	25,3 \pm 17,3	36,1 \pm 40,1*

*Diferença significativa em relação ao grupo controle, $p < 0,05$ - Teste t-*Student*.

2.2. DETERMINAÇÃO DOS ELEMENTOS PELO MÉTODO PIXE

Os elementos químicos presentes nas amostras, determinados pela técnica de PIXE, foram: Na, Mg, Al, Si, P, S, Cl, K, Ca, Fe, Cu, Zn, Br e Rb (Tabela 2). A matriz orgânica do sangue (composição orgânica da amostra) foi de 72,50% de carbono, 7,50% de oxigênio, 13,50% de nitrogênio e 6,50% de flúor.

Não foi observada diferença nas quantidades de metais no sangue dos trabalhadores (avaliado pelo ANOVA-Kruskal-Wallis, pós-teste de Dunn), quando avaliado pelo PIXE, em relação à função desempenhada na mineração de carvão (área de trabalho, Tabela 2). Desta forma, na avaliação das diferentes correlações, o grupo estudado foi considerado como simplesmente “grupo exposto”. Ao analisar a diferença entre expostos e controles, os expostos apresentaram, de forma significativa maiores quantidades de Al e Si (Teste *t*-Student, com correção de Welch) (Tabela 3). Os metais não demonstraram correlação com a idade e tempo de exposição (Correlação de Spearman).

Tabela 2. Concentração de elementos químicos nas amostras de sangue (ppm) do grupo exposto dividido por áreas de trabalho (média e desvio padrão).

Áreas de trabalho		Elementos químicos (ppm)													
		Na	Mg	Al	Si	P	S	Cl	K	Ca	Fe	Cu	Zn	Br	Rb
Embarque de carvão (n=15)	Média	7788	231,6	132,6	72,5	1565	5443	13216	8811	305,6	2658	5,4	37,5	17,7	21,1
	Desvio padrão	1784	183,2	62,7	101	289,4	779	3973	2499	91,2	363,3	2,4	8,0	6,3	9,5
Manutenção de equipamento em campo (n=18)	Média	8450	172,3	150,2	96,9	1517	5354	14473	9001	297,8	2854	5,3	36,6	17,4	18,3
	Desvio padrão	2235	88,5	61,0	123	359,8	1491	3834	2315	103,3	704,1	2,2	12,8	7,0	12,2
Mineração de carvão (n=17)	Média	7855	204,6	127,0	90,8	1526	5388	13003	8524	276,4	2775	4,4	34,3	15,2	19,0
	Desvio padrão	2398	120,9	46,4	65,1	473,8	1234	3916	2544	80,8	635	2,1	11,3	7,4	8,8
Transporte de carvão extraído (n=50)	Média	8042	218,9	117,1	71,1	1525	5401	13531	8675	291	2783	5,0	37,0	17,4	17,7
	Desvio padrão	1900	201,8	62,5	90,5	466,7	877,6	2794	1786	119,7	482,4	1,9	8,7	8,1	11,4

Tabela 3. Concentração média de elementos químicos nas amostras de sangue (ppm) do grupo exposto e grupo controle (média e desvio padrão).

Grupo		Elementos químicos (ppm)													
		Na	Mg	Al	Si	P	S	Cl	K	Ca	Fe	Cu	Zn	Br	Rb
Controle	Média	8942	208,9	109,4	43,9	1629	5717	14927	9285	311,7	2945	5,1	39,0	17,6	16,8
	Desvio padrão	1657	80,7	50,2	29,8	283,9	892	2623	1481	115,5	430,5	1,8	8,8	8,6	9,2
Exposto	Média	8049	209,7	127,2*	81,3***	1529	5396	13572	8731	291,9	2777	5,0	36,5	17,1	18,5
	Desvio padrão	2019	170,0	60,3	94,7	422,3	1051	3366	2109	106,1	537,5	2,0	9,8	7,5	10,7

* Diferença significativa em relação ao grupo controle para o mesmo metal, $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$; Teste *t*-Student (correção de Welch).

V. DISCUSSÃO GERAL

V. DISCUSSÃO GERAL

A mineração de carvão é uma atividade com um alto potencial de contaminação ambiental. Estudos a este respeito têm sido conduzidos ao redor do mundo sobre os efeitos danosos da exposição ao carvão (Da silva 2000; Lan & He, 2004; Celik et al., 2007; León et al., 2007; Nakajima et al., 2008; Zocche et al., 2010).

Para o caso da exposição a resíduos de mineração do carvão, os estudos onde são utilizados biomarcadores de efeito, susceptibilidade e exposição como ferramentas epidemiológicas continuam sendo escassos e grande parte provêm de estudos realizados em jazidas subterrâneas (Agostini et al., 1996; Moriske et al., 1996; Santa María et al., 2007; Donbak et al., 2005). A céu aberto, a exposição do carvão a fatores ambientais como a luz solar facilita os processos de combustão espontânea, no qual são liberados HAP, metais pesados, entre outros. Estes resíduos passam diretamente à atmosfera, onde formam misturas complexas (León et al., 2007). Porém, os efeitos gerados pelos sistemas de exploração a céu aberto sobre a saúde humana permanecem pouco explorados.

Esta controvérsia se faz particularmente importante em países como a Colômbia, onde cerca de 25000 trabalhadores participam da atividade de mineração, e recente evidência sugere que cerca de 70% das minas apresentam deficiências na segurança ocupacional e no controle da contaminação.

Com a finalidade de conhecer o estado da arte sobre os riscos ocupacionais da mineração do carvão, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos genotóxicos, citogenéticos e a presença de metais na população de trabalhadores exposta aos resíduos de mineração do carvão em Guajira- Colômbia.

Como foi demonstrado no Capítulo I, não foi encontrada influência do consumo de álcool, idade e tempo de serviço na indução de dano no DNA e na indução de micronúcleos em linfócitos no grupo exposto (Tabela 1). Recentemente, em diferentes estudos de biomonitoramento de populações expostas não foi observada associação entre estas variáveis e o dano genético avaliado (Rekhadevi et al., 2010; Martínez et al., 2010; Diler & Celik, 2011). Em adição, nos resultados obtidos na frequência de micronúcleos avaliados em mucosa oral (Capítulo II), também não foi encontrada influência entre o consumo de álcool, idade e tempo de serviço. De fato, a maioria dos estudos ocupacionais realizados com o teste de micronúcleos em mucosa oral não consegue estabelecer contribuições estatisticamente significativas da idade e estilos de vida na população de estudo (Holland et al., 2008).

Como foi observado no Capítulo I, o grupo exposto aos resíduos de mineração de carvão mostraram um significativo dano no DNA em linfócitos do sangue periférico (avaliado pelo ensaio cometa e na frequência de micronúcleos) comparado com o grupo controle (Tabela 2). Em adição, na detecção dos efeitos citogenéticos na mucosa oral abordada no Capítulo II, foi mostrado que a frequência micronúcleos no grupo exposto aos resíduos de mineração de carvão é significativamente maior do que o grupo controle (Tabela 1).

No Capítulo I, também foi observado que não existe diferença significativa entre as quatro atividades de mineração (transporte de carvão, manutenção de equipamento em campo, mineração de carvão, embarque de carvão, Tabela 2) avaliadas mediante ensaio cometa e micronúcleos em linfócitos. Resultados similares foram encontrados na avaliação da frequência de micronúcleos na mucosa oral (Figura 1- Capítulo II). O que indica que os trabalhadores apresentaram uma resposta genotóxica à mistura complexa independentemente da área na que trabalham. Até agora, vários estudos têm sido feitos com resultados que mostraram um grande risco ocupacional na mineração de carvão, mas a maioria foi desenvolvido em populações expostas a

mineração subterrânea (Santa Maria et al., 2007; Ulker et al., 2008; Raulf-Heimsoth et al., 2008; Miller & MacCalman, 2010), são poucos os estudos feitos em mineração a céu aberto, onde os componentes encontram-se em misturas complexas.

A avaliação do risco tendo deste tipo de misturas implica em grande dificuldade no que diz respeito à identificação dos componentes tóxicos. Além disso, a insuficiência de dados de toxicidade e escassez de conhecimento acerca do comportamento de substâncias tóxicas e genotóxicas em misturas complexas são fatores que dificultam a avaliação. A falta de informação acerca do comportamento de substâncias tóxicas em misturas complexas é frequentemente evitado por assumir-se que a toxicidade de uma mistura simplesmente é a soma dos efeitos esperados de cada componente da mistura (Ergene et al., 2007).

Ao correlacionar os resultados obtidos na frequência de micronúcleos em linfócitos (Capítulo I) com a frequência de micronúcleos em mucosa oral (Capítulo II) no grupo exposto, foi obtida uma correlação positiva e significativa (Figura 2).

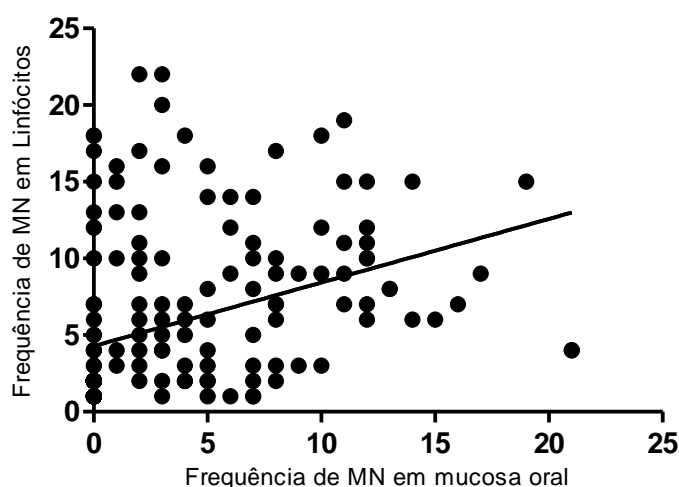


Figura 2. Gráfico da correlação linear entre a frequência de micronúcleos em linfócitos e na mucosa oral

A compilação realizada por Ceppi et al. (2010) de 19 estudos que mediram a frequência de MN em células da mucosa bucal e em linfócitos mostrou uma alta correlação entre ambos os tecidos, revelando que a avaliação de MN na mucosa bucal, embora ocorra a uma frequência mais baixa do que em linfócitos, têm um potencial similar para demonstrar os efeitos da exposição a agentes genotóxicos. A formação de micronúcleos tanto em linfócitos como em células epiteliais têm sido realizados proposto como um biomarcador útil para avaliar o dano citogenético em estudos de biomonitoramento (Diler & Celik, 2011). Estes estudos tem sido levados a cabo em populações expostas à radiação ionizante, trabalhadores de estações de gás, trabalhadores expostos à pesticidas, estireno, dióxido de etileno e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (Karahalil et al., 1999; Ramirez & Cuenca, 2001; Celik et al., 2003; Celik & Kanık, 2006).

No capítulo II foi feita uma análise de outros biomarcadores da mucosa oral relacionados com o dano citogenético (Tabela 1) como broto nuclear (*nuclear bud*) e de morte celular como *cariorrética* e *cariólise*, os quais foram significativamente maiores no grupo exposto comparado com o grupo controle. Vários estudos têm sido feitos considerando estes biomarcadores (conforme revisado em Ceppi et al.,2010). Em adição, Montero et al. (2003) Revazova et al. (2001) consideraram os nuclear buds como resultado de dano genético no epitélio bucal. Cariorrética e cariólise são considerados consequência da morte celular programada ou apoptose (Diler & Celik, 2011). Estes resultados citogenéticos encontrados em nosso estudo, fazem pensar que estes eventos poderiam ser consequência da exposição a alguns agentes genotóxicos relacionados com os resíduos da mineração do carvão.

A análise de MN em células esfoliadas da mucosa oral possui uma importância relevante levando em consideração que cerca de 92% dos casos de câncer tem uma origem epitelial (Rosin & Gilbert, 1990; Holland et al. 2008). As células da mucosa oral estão em constante contato com o ambiente, fato que sugere que o epitélio oral é um

importante alvo para tóxicos inalados, tendo a capacidade de metabolizar carcinógenos em produtos reativos (Holland et al. 2008) sendo, portanto, razoável que exibiram evidencia de genotoxicidade (Ceppi et al., 2010). Em exposições ocupacionais, as células epiteliais são uma rota direta de poluentes aerotransportados e que podem ser metabolizados a carcinógenos (Stone et al., 1995; Rekhadevi et al., 2009). Este teste é útil para a avaliação do risco de câncer no trato aerodigestivo superior (Bloching et al., 2000).

A principal via de exposição dos trabalhadores de minas de carvão aos resíduos potencialmente perigosos do carvão é mediante a inalação de suas partículas. Hoje é conhecido que a inalação crônica deste coquetel (que pode conter uma mistura de substâncias como metais pesados, cinzas, ferro, HAP e enxofre) pode produzir desde desordens pulmonares (pneumoconiose simples, fibrose massiva progressiva, bronquite, perda de função pulmonar, enfisema) até câncer (Schins y Borm, 1999; Beckman- Ames, 1997; Cooke et al., 2003). Alguns parâmetros de qualidade do carvão de “El Cerrejón” são umidade (~10%), voláteis (~30%), cinzas (~8%), enxofre (~1%), carbono (~70%), hidrogênio (~6%), oxigênio (~5%), nitrogênio (~1%) e diferentes metais (ETSU & Department of Trade and Industry, 2000).

É muito comum que nos centros de armazenamento dos sistemas de mineração ao céu aberto se produza uma combustão espontânea do carvão, que é uma das principais causas de produção de HAP. Muitos HAP produzem efeitos mutagênicos e carcinogênicos (Cherng et al., 1996; Da Silva et al., 2000). Dentre os HAP relacionados com mineração do carvão, estão benz[a]antraceno, crisene, benzo[a]pireno, indeno[1,2,3-c,d]pireno e benzo[g,h,i]perileno (Sai, 1995). A Agencia Internacional para pesquisa sobre o câncer (IARC) descreveu os HAP como carcinógenos (IARC, 1998). Um dos mecanismos propostos de geração de dano no DNA pela exposição a HAP está associado com processos de oxi-redução ocorridos durante o metabolismo

destes compostos, o qual dá lugar a formação de quinonas que podem induzir ROS via redox (Singh et al., 2007).

Outra via de geração de ROS pela exposição aos resíduos de mineração do carvão, está relacionada com a inalação de partículas de pó de carvão que desencadeia uma resposta celular inflamatória no pulmão pelos macrófagos e células epiteliais gerando grandes quantidades de ERO e citocinas (Schins & Borm, 1999). As ERO também podem ser geradas de forma independente da via celular devido às propriedades químicas intrínsecas do pó de carvão, como o conteúdo de ferro e radicais na superfície (Schins & Borm, 1999). É conhecido que as ERO têm a capacidade de causar dano oxidativo no DNA do tipo quebras simples e modificações de base e nucleótidos, particularmente na sequência com conteúdo de guanosina. As modificações oxidativas induzem uma ampla resposta no reparo caracterizada pela excisão de bases modificadas e nucleótidos (Bennett, 2001; Klaunig et al. 2011).

Em relação à análise dos metais presentes nas amostras de sangue descrita no Capítulo II, a Tabela 2 mostra os elementos que foram detectados mediante o método PIXE. Nos resultados eram esperadas altas concentrações de metais relacionados com a mineração de carvão, como são vanádio, chumbo, cádmio, níquel. Porém, estes não foram detectados talvez pelo fato do tecido sanguíneo não ser o sítio alvo para detecção do acúmulo destes metais ou, talvez, estes estivessem em concentrações muito baixas para serem detectados mediante esta técnica.

Dos elementos avaliados mediante o método PIXE, foram detectados os elementos Na, Mg, Al, Si, P, S, Cl, K, Ca, Fe, Cu, Zn, Br e Rb. Os elementos avaliados nas amostras do sangue não apresentaram diferença em relação às quatro áreas de trabalho analisadas, e também não houve correlação com a idade e tempo de serviço fato que coincide com os resultados encontrados na frequência de micronúcleos em mucosa oral e os resultados correspondentes ao nosso estudo anterior (Capítulo I).

Na análise dos níveis dos elementos encontrados nos grupos expostos e controles, foram observadas quantidades significativamente maiores de Si e Al para o grupo exposto (Tabela 3, Capítulo II). Na composição do carvão de Cerrejón-Guajira estes elementos são encontrados em quantidades consideráveis em forma de óxidos (ETSU & Department of Trade and Industry, 2000), e é reconhecida a presença de Al e Si nas cinzas voláteis do carvão (Pralhad et al., 2000). A abundância dos diferentes elementos minerais no carvão de Cerrejón, determinada por Microscopia Eletrônica de Varredura Controlada por Computador, mostram que mais de 80% do peso do material mineral é composto de minerais de argila e quartzo (Silicato de Alumínio-*Alsil*, Silicato de alumínio e sílice-*Si-alsil* e Sílice-*Si*) (Irons et al., 2000). A análise do produto da combustão revela que as cinzas estão formadas principalmente de silicatos de alumínio, óxido de ferro e partículas de quartzo (Irons et al., 2000).

É reconhecido que a inalação de material particulado normalmente contém altos níveis de alumínio. Alguns estudos têm sugerido que a exposição a altas quantidades de alumínio pode causar doenças neurológicas (Buchta et al., 2003; Fattoretti et al., 2004) e problemas renais (ATSDR, 2008; Peto, 2010; Pohl et al., 2011). Estudos experimentais indicam que a presença de Al está associada com processos inflamatórios no pulmão os quais podem desencadear doenças respiratórias (Clarke et al., 2000; Wagner et al., 2007) e processos cancerígenos (Spinelli et al., 2006; Exley et al., 2007). A toxicidade do Al está associada à efeitos complicados, tais como inibição do sistema de reparo no DNA, mudanças na estrutura e estabilidade no DNA (Lankoff et al., 2006), alteração da atividade de enzimas antioxidantes, aumentando a produção de espécies reativas do oxigênio (ERO) (Khanna and Nehru, 2007; Kumar et al., 2009), e interferência nas funções mitocondriais (Kumar et al., 2008), entretanto, o mecanismo exato da toxicidade do Al ainda não é claro (Wu et al., 2010).

Grande parte do material mineral do carvão de Cerrejón está composto por silicato de alumínio e sílice (Irons et al., 2000). Tem sido documentado que a inalação de material que contem silício pode causar efeitos crônicos na respiração, irritação dos pulmões e da membrana mucosa. De fato, o câncer de pulmão está associado com exposições a silício cristalino (principalmente quartzo e cristobalita) (Soutar et al., 2000; Neumann et al., 2011). É reconhecido que a inalação de partículas de pó que contem sílice induz silicose. Os macrófagos e neutrófilos desempenham um papel importante nesta patologia pulmonar (Fubini & Hubbard, 2003). À captação destas partículas de sílice pelos macrófagos ativa a produção ERO (incluindo H_2O_2) via estresse oxidativo, que, por sua vez, contribui para dano pulmonar e morte nos macrófagos (Rimal et al., 2005; Sayes et al., 2007; Persson, 2005; Giorgio et al., 2007).

Em resumo, devido ao fato de que o dano no DNA (observado pelo aumento de micronúcleos e níveis dos parâmetros do teste cometa) e a morte celular (observada pelo aumento de células cariorrética e cariólise) são considerados os principais mecanismos durante a carcinogênese, estes dados podem ser relevantes na avaliação do risco nestas populações expostas a mineração de carvão. Neste estudo, ainda pode ser feita a inferência de que existe uma contribuição, em nossos resultados, da presença dos metais Al e Si, tendo-se consciência de que são vários os compostos que são liberados durante os processos de exploração e extração de carvão e que, portanto, devido à mistura complexa, é difícil relacionar os efeitos citogenéticos e genotóxicos encontrados com um único composto genotóxico.

VI. CONCLUSÕES

VI. CONCLUSÕES

1. Conclusão Geral

O conjunto de resultados desta dissertação permite concluir que os resíduos de mineração de carvão causam dano no DNA, expresso em efeitos genotóxicos e citogenéticos, avaliados na população de trabalhadores da mina de carvão em Guajira-Colômbia.

2. Conclusões Específicas

- ✓ O dano no DNA avaliado pelo ensaio cometa e pelo teste de micronúcleos em linfócitos foi maior nos trabalhadores expostos a mineração de carvão do que no grupo controle.
- ✓ Na avaliação da frequência de alterações citogenéticas pelo teste de micronúcleos na mucosa bucal, os trabalhadores expostos a mineração de carvão mostraram uma maior frequência de micronúcleos do que os indivíduos controle.
- ✓ Na análise de outros biomarcadores na mucosa bucal, como cariorrética e cariólise (relacionado com morte celular) e nuclear bud (relacionado com amplificação gênica), estes foram significativamente maiores no grupo de trabalhadores expostos a mineração de carvão comparado com o grupo controle.
- ✓ Na avaliação da influência dos hábitos de vida, o consumo de álcool, idade e tempo de serviço não teve influência sobre o dano avaliado (ensaio cometa e teste de micronúcleos) nos trabalhadores de mineração de carvão.

- ✓ Não foi encontrada diferença significativa entre as quatro atividades dentro da cadeia de produção de carvão (transporte de carvão extraído, manutenção de equipamento no campo, mineração de carvão e embarque de carvão) e os biomarcadores ensaio cometa e micronúcleos em linfócitos.
- ✓ Os resultados obtidos na frequência de micronúcleos na mucosa oral e na frequência de micronúcleos em linfócitos no grupo exposto tiveram uma correlação positiva e significativa.
- ✓ Na análise dos elementos presentes nas amostras do sangue pelo método PIXE foram detectados os elementos Na, Mg, Al, Si, P, S, Cl, K, Ca, Fe, Cu, Zn, Br e Rb.
- ✓ Não foi achada correlação entre a função (área de trabalho) e os níveis de elementos presentes nas amostras de sangue dos trabalhadores de mineração de carvão. Também não houve correlação dos metais com a idade e tempo de exposição.
- ✓ Na análise dos valores entre os grupos expostos e controles, foi encontrada quantidades significativamente maiores de Si e Al para o grupo exposto, metais comumente relacionados com mineração de carvão.



VII. PERSPECTIVAS

VII. PERSPECTIVAS

Seria de grande importância complementar os dados mostrados nesta dissertação para uma melhor compreensão dos efeitos gerados pela exposição a resíduos de mineração de carvão, nos seguintes aspectos:

- ✓ Determinar as concentrações de HAP contidas no material particulado para conhecer os níveis de exposição dos trabalhadores.
- ✓ Usar uma técnica mais sensível como ICP (plasma de acoplamento indutivo) para determinar as concentrações de metais pesados presentes nas amostras de sangue nos trabalhadores.
- ✓ Incluir biomarcadores específicos para a detecção de dano oxidativo no DNA, por exemplo o teste cometa modificado com enzimas de reparo *endonuclease III* (ENDO III), a qual detecta pirimidinas oxidadas e com *formamidopirimidina DNA glicosilase (FPG)* para detectar 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG), principal produto da oxidação de purinas.
- ✓ Incluir a análise de 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG), na urina.
- ✓ Incluir um biomarcador específico para a avaliação de HAP nos trabalhadores expostos a mineração de carvão, como por exemplo análise na urina de 1-*pirenol*.
- ✓ Avaliar a formação de adutos no DNA em urina.
- ✓ Medir em plasma e soro a capacidade antioxidante (TBARS, SOD, CAT).
- ✓ Realizar estudos *in vitro* em diferentes linhagens celulares sobre o efeito das partículas de pó de carvão.



VIII. BIBLIOGRAFIA

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agostini J, Otto P, Wajntal A. Chromosome damage in underground coal miners: detection by conventional cytogenetic techniques and by submitting lymphocytes of unexposed individuals to plasma from at-risk groups. *Braz J Genet* 1996;19:641-6.

Agova S, Groseva D, Panev T, Popov T, Toncheva D , Hadjidekova V. 2005. Effect of Environmental Exposure to PAHs on Somatic Chromosomes, *Turk J Med Sci*. Vol 35. p. 143-148.

Arnaiz Rodríguez, R. 1998. Las Toxinas ambientales y la Genética. Available on line: omega.ilce.edu.mx:3000/sites/ciencia/volumen3/ciencia3/124/htm/sec_7.htm

ASTMD, The American Society for Testing and Materials. 2006. Standard Clasification of Coal by Rank. ASTMD international. D 388-05.

ATSDR, Agency for toxic substances and disease registry-ToxFAQs (1993). Toxicological profile for: Lead, Cadmium, Nickel, Vanadium and Zinc. University of Utah. Available on line. Website: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxfaq.html>.

ATSDR, Agency for toxic substances and disease registry-ToxFAQs (2008). Toxicological profile for aluminium, CAS # 7429-90-5. Available on line. Website: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxfaq.html>.

Baird W.M, Hooven L.A, Mahadevan B. Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 45:106.114 (2005)

Balachandar V, Kumar RK, Prakash V, Devi SM, Kumar BL, Manikantan P, Sasikala K, Malathi J, Brahmanandhan M, Khanna D, Selvasekarapandian S. Evaluation of genetic alterations in inhabitants of a naturally high level background radiation and kudankulam nuclear power project site in India. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2011;12(1):35-41.

Beckman, K.B, Ames, B.N. (1997) Oxidative decay of DNA. *J. Biol. Chem*. Vol 272. p. 19633-19636.

Bennett MR. Reactive oxygen species and death: oxidative DNA damage in atherosclerosis. *Circ Res*. 2001 Apr 13;88(7):648-50.

Bloching M, Hofmann A, Lautenschlager Ch, Berghaus A, Grummt T. Exfoliative cytology of normal buccal mucosa to predict the relative risk of cancer in the upper aerodigestive tract using the MN-assay. *Oral Oncol* 2000; 36: 550-555.

Bolormaa Oyuntsetseg, Baasansuren Jamsranjav, Kawasaki Katsunori, Toshiyuki Hattori Makiko Watanabe. PIXE analysis of heavy metals in water samples from a mining area in Mongolia. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* 243 (2006) 161–166.

Bonassi S, Biasotti B, Kirsch-Volders M, Knasmueller S, Zeiger E, Burgaz S, Bolognesi C, Holland N, Thomas P, Fenech M; HUMNXL Project Consortium. State of the art survey of the buccal micronucleus assay--a first stage in the HUMN(XL) project initiative. *Mutagenesis*. 2009 Jul;24(4):295-302.

Bonassi Stefano, Norppa Hannu, Ceppi Marcello, Strömberg Ulf, Vermeulen Roel, Znaor Ariana, Cebulska-Wasilewska Antonina, Fabianova Eleonora,, Fucic Alexandra, Gundy Sarolta, Hansteen Inger-Lise, Knudsen Lisbeth E., Lazutka Juozas, Rossner Pavel, Sram Radim J., Boffetta Paolo. Chromosomal aberration frequency in lymphocytes predicts the risk of cancer: results from a pooled cohort study of 22 358 subjects in 11 countries. *Carcinogenesis* (2008) 29 (6): 1178-1183.

Braz G.M, Mazoti M.A, Giacobino J, Braz G.L, Golim M. A, Ferrasi A.C, Carvalho L., Braz J.R., Salvadori F. D.M. Genotoxicity, cytotoxicity and gene expression in patients undergoing elective surgery under isoflurane anaesthesia. 2011. *Mutagenesis* pp. 1–6.
Brendler-Schwaab, S. Hartmann A, Pfuhler s, speit G. The in vivo comet assay: use and status in genotoxicity testing. Review. 2005. *Mutagenesis*, 20: 245-254.

Brendler-Schwaab, S., Hartmann, A., Pfuhler, S. and Speit, G. The in vivo comet assay: use and status in genotoxicity testing. 2005. *Mutagenesis* 20: 245-254.

Buchta M, Kiesswetter E, Otto A, Schaller KH, Seeber A, Hilla W, Windorfer K, Stork J, Kuhlmann A, Gefeller O, Letzel S. Longitudinal study examining the neurotoxicity of occupational exposure to aluminium-containing welding fumes. *Int Arch Occup Environ Health*. 2003 Sep;76(7):539-48.

Camargo M. Citometría de flujo y genética en el análisis de estrés oxidativo por contaminantes ambientales y ocupacionales, Resumen In IV Congreso Internacional y VII congreso Colombiano de genética, 2006. *Salud UIS Vol. 38 No 1. Bucaramanga*.

Campbell, J.L. The Guelph PIXE software package III. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*. B170. P.193, 2000.

Celik M, Donbak L, Unal F, Yuzbasioglu D, Aksoy H, Yilmaz S. Cytogenetic damage in workers from a coal-fired power plant, *Mutat Res*. 2007; 627:158-163.

Celik, A., and Kanık, A. (2006). Genotoxicity of occupational exposure to wood dust: micronucleus frequency and nuclear changes in exfoliated buccal mucosa cells. *Environ Mol Mutagen* 47, 693–698.

Celik, A., C, avas,, T., and Ergene-Go"zu" kara, S. (2003). Cytogenetic biomonitoring in petrol station attendants: micronucleus test in exfoliated buccal cells. *Mutagenesis* 18, 417–421.

Ceppi M, Biasotti B, Fenech M, Bonassi S. Human population studies with the exfoliated buccal micronucleus assay: statistical and epidemiological issues. *Mutat Res.* 2010 Jul-Sep;705(1):11-9.

Ceppi M, Biasotti B, Fenech M, Bonassi S. Human population studies with the exfoliated buccal micronucleus assay: statistical and epidemiological issues. *Mutat Res.* 2010 Jul-Sep;705(1):11-9.

Cherng SH, Lin ST, Lee H. Modulatory effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on the mutagenicity of 1-nitropyrene: a structure-activity relationship study. *Mutat Res.* 1996 Apr 6;367(4):177-85.

Clarke RW, Coull B, Reinisch U, Catalano P, Killingsworth CR, Koutrakis P, Kavouras I, Murthy GG, Lawrence J, Lovett E, Wolfson JM, Verrier RL, Godleski JJ. Inhaled concentrated ambient particles are associated with hematologic and bronchoalveolar lavage changes in canines. *Environ Health Perspect.* 2000 Dec;108(12):1179-87.

Cohn CA, Laffers R, Simon SR, O'Riordan T, Schoonen MA. Role of pyrite in formation of hydroxyl radicals in coal: possible implications for human health. *Part Fibre Toxicol.* 2006 Dec 19;3:16.

Cooke M.S., Evans M.D., Dizdaroglu M., Lunec J., Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease, *FASEB J.* 17. 2003. 1195–1214.

Da Silva, J., De Freitas, T.R.O., Heuser, V., Marinho, J. and Erdtmann, B Genotoxicity biomonitoring in coal regions using wild rodent *Ctenomys torquatus* by Comet Assay and Micronucleus Test. *Environmental and Molecular Mutagenesis.* 2000. Vol. 35. p. 270-278.

Diler SB, Celik A. Cytogenetic Biomonitoring of Carpet Fabric Workers Using Micronucleus Frequency, Nuclear Changes, and the Calculation of Risk Assessment by Repair Index in Exfoliated Mucosa Cells. *DNA Cell Biol.* 2011.

Donbak L, Rencuzogullari E, Yavuz A, Topaktas M. The genotoxic risk of underground coal miners from Turkey, *Mutat Res.* 2005; 588: 82-87.

Ergene S, Celik A, Cavaş T, Kaya F. Genotoxic biomonitoring study of population residing in pesticide contaminated regions in Göksu Delta: micronucleus, chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges. *Environ Int.* 2007 Oct;33(7):877-85.

ETSU & Department of Trade and Industry. The fate of trace elements in PF combustion systems. Report No. COAL R193 - DTI/Pub URN 00/947 <http://webarchive.nationalarchives.gov.uk/tna/+http://www.dti.gov.uk/files/file18569.pdf/>; 2000.

Exley C, Charles LM, Barr L, Martin C, Polwart A, Darbre PD. Aluminium in human breast tissue. *J Inorg Biochem.* 2007 Sep;101(9):1344-6.

Fattoretti P, Bertoni-Freddari C, Baliotti M, Giorgetti B, Solazzi M, Zatta P. Chronic aluminum administration to old rats results in increased levels of brain metal ions and enlarged hippocampal mossy fibers. *Ann N Y Acad Sci.* 2004 Jun;1019:44-7.

Fenech M, Kirsch-Volders M, Natarajan AT, Surralles J, Crott JW, Parry J, Norppa H, Eastmond DA, Tucker JD, Thomas P. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis.* 2011 Jan;26(1):125-32.

Follmer C, Carlini C.R, Yoneama M.-L and Dias J.F. PIXE analysis of urease isoenzymes isolated from *Canavalia ensiformis* (jack bean) seeds. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms.* Volume 189, Issues 1-4, April 2002, Pages 482-486.

Fubini, B., and A. Hubbard. 2003. Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) generation by silica in inflammation and fibrosis. *Free Radic. Biol. Med.* 34: 1507–1516.

García-Lestón J, Roma-Torres J, Vilares M, Pinto R, Cunha LM, Prista J, Teixeira JP, Mayan O, Pásaro E, Méndez J, Laffon B. Biomonitoring of a population of Portuguese workers exposed to lead. (2011) *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 721(1):81-88.

Gilmour MI, O'Connor S, Dick CA, Miller CA, Linak WP. Differential pulmonary inflammation and in vitro cytotoxicity of size-fractionated fly ash particles from pulverized coal combustion. *J Air Waste Manag Assoc.* 2004 Mar;54(3):286-95.

Giorgio, M., M. Trinei, E. Migliaccio, and P. G. Pelicci. 2007. Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 722–728.

Hartley JM, Spanswick VJ, Hartley JA. Measurement of DNA Damage in Individual Cells Using the Single Cell Gel Electrophoresis (Comet) Assay. *Methods Mol Biol.* 2011;731:309-320.

Henriques, J.A.P., Dafré, L.A., Picada, J.N. Maris, A.F. Espécies reativas de oxigênio e avaliação de antioxidantes em sistemas biológicos, In: Serafini, L.A., Barros, N., Azevedo, J.L. 2001. *Biotecnologia na agricultura e na agroindústria.* Editora Agropecuária, Guaíba.

Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, Knasmueller S, Fenech M. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. *Mutat Res.* 2008 Jul-Aug;659(1-2):93-108.

IARC, International Agency for Research on Cancer, Agents Classified by the IARC Monographs, Volumes 1–100. Cas N° 000050-41-9. 1998; 68.

Información Minera de Colombia, la economía del Carbón en la Costa Atlántica, IMC, www.imcportal.com. 2009.

Irons, R. M. A., W. Quick, et al. (2000). The fate of trace elements in pulverised fuel (PF) combustion systems, PowerGen UK plc, CRE Group Ltd, University of Nottingham. R193.

Jayakaran F, Thomas IM. Sister-chromatid exchanges in anesthetists. *Indian J Occup Environ Med* 2005;9:86-9.

Jean C.G. Paiva, Igor O. Cabral, Bruno M. Soares, Carla M.L. Sombra, Jose R.O. Ferreira, Manoel O. Moraes, Bruno C. Cavalcanti, and Claudia Pessoa. Biomonitoring of Rural Workers Exposed to a Complex Mixture of Pesticides in the Municipalities of Tiangua and Ubajara (Ceara State, Brazil): Genotoxic and Cytogenetic Studies. *Environmental and Molecular Mutagenesis.* 2011.

Jegadeesan G., Souhail R. Al-Abed, Patricio Pinto. Influence of trace metal distribution on its leachability from coal fly ash. *Fuel* 87. 2008. 1887–1893.

Johansson, S.A.E., Campbell, J.L., Malmqvist, K.G. Particle-induced X-ray emission spectrometry (PIXE): John Wiley & Sons, INC. 1995.

Johansson, T.B., Akselsson, K.R., Johansson, S.A. Elemental trace analysis at the 10^{-12} g level. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research* 84, p.141, 1970.

Karahalil, B., Karakaya, A.E., and Burgaz, S. (1999). The micronucleus assay in exfoliated buccal cells: application to occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutat Res* 442, 29–35.

Kasprzak, K.S., Jaruga, P., Zastawny, T.H., North, S.L., Riggs, C.W., Olinski, R., Dizdaroglu, M. Oxidative DNA base damage and its repair in kidneys and livers of nickel(II)-treated male F344 rats. 1997. *Carcinogenesis* 18, 271–277.

Kern A.L. Kern, Bonatto D., J.F. Dias, M.L. Yoneama, M. Brendel and J.A.P. Henriques, The importance of yeast Alr proteins in cadmium detoxification as indicated by particle-induced X-ray emission and phenotypic analyses, *X-ray Spectrometry* 34 (2004), pp. 355–358.

Khanna, P., Nehru, B., 2007. Antioxidant enzymatic system in neuronal and glial cells enriched fractions of rat brain after aluminum exposure. *Cell. Mol. Neurobiol.* 27, 959–969.

Klaunig JE, Wang Z, Pu X, Zhou S. Oxidative stress and oxidative damage in chemical carcinogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2011.

Kumar, V., Bal, A., Gill, K.D., 2009. Susceptibility of mitochondrial superoxide dismutase to aluminum induced oxidative damage. *Toxicology* 255, 117–123.

Kumar, V., Bal, A., Gill, K.D., 2008. Impairment of mitochondrial energy metabolism in different regions of rat brain following chronic exposure to aluminum. *Brain Res.* 1232, 94–103.

Lan Q, He X. Molecular epidemiological studies on the relationship between indoor coal burning and lung cancer in Xuan Wei, China. *Toxicology.* 2004 May 20;198(1-3):301-5.

Lankoff, A., Banasik, A., Duma, A., Ochniak, E., Lisowska, H., Kuszewski, T., Gozdz, S., Wojcik, A., 2006. A comet assay study reveals that aluminum induces DNA damage and inhibits the repair of radiation induced lesions in human peripheral blood lymphocytes. *Toxicol. Lett.* 161, 27–36.

Leffa DD, Damiani AP, da Silva J, Zocche JJ, dos Santos CE, Boufleur LA, Dias JF, de Andrade VM. Evaluation of the genotoxic potential of the mineral coal tailings through the *Helix aspersa* (Müller, 1774). *Arch Environ Contam Toxicol.* 2010 Nov;59(4):614-21.

León G, Perez LE, Linares JC, Hartmann A, Quintana M. Genotoxic effects in wild rodents (*Rattus rattus* and *Mus musculus*) in an open coal mining area. *Mutat Res* 2007; 630: 42-9.

Liao W, McNutt MA, Zhu WG. The comet assay: a sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. *Methods.* 2009 May;48(1):46-53.

Linda A. McCauleya; Michael Lasarevb; Juan Munizb; Valle Nazar Stewartb; Glen Kisbyb . Analysis of Pesticide Exposure and DNA Damage in Immigrant Farmworkers . Journal of Agromedicine. Volume 13, Issue 4, 2008, Pages 237 - 246.

Martínez A, Coleman M, Romero-Talamás C.A, Frías A. An assessment of immediate DNA damage to occupationally exposed workers to low dose ionizing radiation by using the comet assay. Rev Invest Clin 2010; 62 (1): 23-30.

Martino-Roth, M.G., Viégas, J. Roth, D.M. Occupational genotoxicity risk evaluation through the comet assay and the micronucleus test. 2003.Genet. Mol. Res. Vol 2. No 4. p. 410-417.

Mastrangelo, G., Fadda, E. Marzia, V. Polycyclic aromatic hydrocarbons and cancer in man. Environ Health Perspect. .1996.Vol 104. p. 1166–1170.

Maxwell, J.A., Campbell, J.L., Teesdale, W.J. The Guelph PIXE software package. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B43. P.218-230, 1989.

Miller BG, MacCalman L. Cause-specific mortality in British coal workers and exposure to respirable dust and quartz. Occup Environ Med. 2010 Apr;67(4):270-6

Møller P. The alkaline comet assay: towards validation in biomonitoring of DNA damaging exposures. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2006 Apr;98(4):336-45.

Montero, R., Serrano, L., Davila, V., Segura, Y., Arrieta, A., Fuentes, R., Abad, I., Valencia, L., Sierra, P., and Camacho, R. (2003). Metabolic polymorphisms and the micronucleus frequency in buccal epithelium of adolescents living in an urban environment. Environ. Mol Mutagen 42, 216–222.

Moriske HJ, Drews M, Ebert G, Menk G, Scheller C, Schöndube M, Konieczny L. Indoor air pollution by different heating systems: coal burning, open fireplace and central heating. Toxicol Lett. 1996 Nov;88(1-3):349-54.

Naga Raju GJ, Sarita P, Ramana Murty GA, Ravi Kumar M, Reddy BS, Charles MJ, Lakshminarayana S, Reddy TS, Reddy SB, Vijayan V. Estimation of trace elements in some anti-diabetic medicinal plants using PIXE technique. Appl Radiat Isot. 2006 Aug;64(8):893-900.

Nakajima T, Hasegawa H, Nakamata S, Takanashi H, Ohki A. Mutagenicity of eluent by hot water extraction of various coals: Effect of chlorination. Fuel 87 (2008) 3132–3136.

Neumann V, Schulz F, Theile A, Löseke S, Püschel K, Tannapfel A. Case Report of a Rare Occupational Disease: A During Life Non-Recognised Occupational Disease – Talcosis. *Pneumologie*. 2011 Mar 16.

Olewińska E, Kasperczyk A, Kapka L, Kozłowska A, Pawlas N, Dobrakowski M, Birkner E, Kasperczyk S. Level of DNA damage in lead-exposed workers. *Ann Agric Environ Med*. 2010 Dec;17(2):231-6.

Olive, P.L., Wlodek, D., Durand, R.E., Banáth, J.P. 1992 Factors Influencing DNA Migration from Individual Cells subjected to Gel Electrophoresis. *Exp. Cell Res*. 198: 259-267.

Ostling, O. & Johanson, k. J. 1984 Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Comun*. 123: 291-298.

Pastor S., Creus A, N. Siffel C., Marcos R. Occupational exposure to pesticides and cytogenetic damage: results of a Hungarian population study using the micronucleus assay in lymphocytes and buccal cells, *Environ. Mol. Mutagen*. 2002. 40 101–109.

Persson, H. L. 2005. Iron-dependent lysosomal destabilization initiates silica induced apoptosis in murine macrophages. *Toxicol. Lett*. 159: 124–133.

Peto MV. Aluminium and iron in humans: bioaccumulation, pathology, and removal. *Rejuvenation Res*. 2010 Oct;13(5):589-98.

Philippe Grandjean, Silbergeld, Ellen K. 2000. Toxicología Herramientas y Enfoques. *Enciclopedia de Salud y Seguridad en el trabajo*.

Pohl HR, Roney N, Abadin HG. Metal ions affecting the neurological system. *Met Ions Life Sci*. 2011;8:247-62.

Prahalad AK, Inmon J, Ghio AJ, Gallagher JE. Enhancement of 2'-deoxyguanosine hydroxylation and DNA damage by coal and oil fly ash in relation to particulate metal content and availability. *Chem Res Toxicol*. 2000 Oct;13(10):1011-9.

Qiu YL, Wang W, Wang T, Sun P, Wu F, Zhu SM, Qian J, Jin L, Au W, Xia ZL. DNA repair gene polymorphisms and micronucleus frequencies in Chinese workers exposed to vinyl chloride monomer. *Int J Hyg Environ Health*. 2011.

Ramirez, V., and Cuenca, P. (2001). Micronuclei frequency in lymphocytes of individuals occupationally exposed to pesticides. *Biol Trop* 49, 1–8.

Ramírez, A. Biomarcadores en monitoreo de exposición a metales pesados en metalurgia. *An Fac Med Lima* 2006; 67(1). 49-58.

Raulf-Heimsoth M, Angerer J, Pesch B, Marczynski B, Hahn JU, Spickenheuer A, Preuss R, Rühl R, Rode P, Brüning T. Biological monitoring as a useful tool for the detection of a coal-tar contamination in bitumen-exposed workers. *J Toxicol Environ Health A*. 2008;71(11-12):746-50.

Rekhadevi P, Rahman M, Mahboob M and Grover P. Genotoxicity in Filling Station Attendants Exposed to Petroleum Hydrocarbons. *Ann. Occup. Hyg.*, Vol. 54, No. 8, pp. 944–954, 2010.

Repetto Jiménez M., Repetto Kuhn G., *Toxicologia fundamental*. 2009. Diaz de Santos. 4ta edición.

Revazova, J., Yurchenko, V., Katosova, L., Platonova, V., Sycheva, L., Khripach, L., Ingel, F., Tsutsman, T., and Zhurkov, V. (2001). Cytogenetic investigation of women exposed to different levels of dioxins in Chapaevsk town. *Chemosphere*. 43, 999–1004.

Rimal, B., A. K. Greenberg, and W. N. Rom. 2005. Basic pathogenetic mechanisms in silicosis: current understanding. *Curr. Opin. Pulm. Med*. 11: 169–173.

Rosin MP. The use of the micronucleus test on exfoliated cells to identify anti-clastogenic action in humans: a biological marker for the efficacy of chemopreventive agents. *Mutat Res*. 1992 Jun;267(2):265-76.

Rosin, M.P., and Gilbert, A.M. (1990). Modulation of genotoxic effects in humans. In: *Mutation and Environment, Part E: Environmental Genotoxicity, Risk and Modulation*. M.L. Meldelsohn and R.J. Albertini, eds. (Wiley-Liss, New York), pp. 351–360.

Sai XC. The pollution of PAH. *Environ Protect* 1995;10:31–3.

Santa Maria S.R, Arana M, Ramirez O. Chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes from male native miners working in the Peruvian Andes. *Genetics and Molecular Biology*. 2007; 30: 1135-1138.

Sayes, C. M., K. L. Reed, and D. B. Warheit. 2007. Assessing toxicity of fine and nanoparticles: comparing in vitro measurements to in vivo pulmonary toxicity profiles. *Toxicol. Sci*. 97: 163–180.

Schins, R. & Borm, P. Mechanisms and Mediators in Coal Dust Induced Toxicity: A Review. *Ann. Occup. Hyg*. 1999. Vol. 32 No 1: p. 7 – 33.

Seval Izdes; Semra Sardas; Ela Kadioglu; Ali Esat Karakayac. DNA Damage, Glutathione, and Total Antioxidant Capacity in Anesthesia Nurses. *Archives of Environmental & Occupational Health*. Volume 65, Issue 4, 2010, Pages 211 – 217.

Shangina OV, Sdvizhkov AM, Finkel'shtern MR, Brennan P, Boffetta P, Zaridze DG. Risk factors of laryngeal cancer in Central and Eastern Europe. *Vopr Onkol.* 2007;53(3):321-8.

Siegele R, Kachenko A. G., Bhatia N. P., Wang Y. D., Ionescu M., Singh B., Baker A. J. M., Cohen D. D. Localisation of trace metals in metal-accumulating plants using μ -PIXE. *X-Ray Spectrometry Special Issue: Pixe 2007.* Volume 37, Issue 2, pages 133–136, March/April 2008.

Singh R, Sram R.J, Binkova B, Kalina I, Popov T.A, Georgieva T, Garte S, Taioli E, Farmer P.B. The relationship between biomarkers of oxidative DNA damage, polycyclic aromatic hydrocarbon DNA adducts, antioxidant status and genetic susceptibility following exposure to environmental air pollution in humans, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis.* 2007; 620: 83-92. Singh, N.P., MCCoy, M.T., Tice, R.R and Schneider, E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individuals cells. *Experimental cell research.* 1988. 175: 184-191.

Solís C., Mireles A., Andrade E. Environmental applications of PIXE at the Institute of Physics, UNAM. *Revista mexicana de fisica S53 (3)* 33–37. 2007.

Soutar CA, Robertson A, Miller BG, Searl A, Bignon J. Epidemiological evidence on the carcinogenicity of silica: factors in scientific judgement. *Ann Occup Hyg.* 2000 Jan;44(1):3-14.

Spinelli JJ, Demers PA, Le ND, Friesen MD, Lorenzi MF, Fang R, Gallagher RP. Cancer risk in aluminum reduction plant workers (Canada). *Cancer Causes Control.* 2006 Sep;17(7):939-48.

Sram R.J., Rossner P., Peltonen K., Podrazilova K., Mrackova G., Demopoulos N.A, Stephanou G., Vlachodimitropoulos D , Darroudi F, Tates A.D. Chromosomal aberrations, sister-chromatid exchanges, cells with high frequency of SCE, micronuclei and comet assay parameters in 1,3 butadiene-exposed workers. *Mut. Res.* Vol 419. p. 145-154.

Stich HF, San RH, Rosin MP. Adaptation of the DNA-repair and micronucleus tests to human cell suspensions and exfoliated cells. *Ann N Y Acad Sci.* 1983;407:93-105.

Stone, J.G., Jones, N.J., McGregor, A.D., and Waters, R. (1995). Development of human biomonitoring assay using buccal mucosa: comparison of smoking related DNA adducts in mucosa versus biopsies. *Cancer Res* 55, 1267–1270.

Teixeira João Paulo, Gaspar Jorge, Coelho Patrícia, Costa Carla, Pinho-Silva Susana, Costa Solange, Da Silva Susana, Laffon Blanca, Pásaro Eduardo, Rueff José and Farmer

Peter. Cytogenetic and DNA damage on workers exposed to styrene. *Mutagenesis* (2010) 25 (6): 617-621.

Teixeira, E.C., Streck, C.D., Braga, C.F., Yoneama, M.L., Dias, J.F., A PIXE study of elements transport in fluvial waters in the Candiota region, Rio Grande do Sul, Brazil. 2004. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. B* 215, 203–213.

Thomas P, Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, Knasmueller S, Fenech M. Buccal micronucleus cytome assay. *Nat Protoc.* 2009;4(6):825-37.

Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.-C and Sasaki, F. Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular. Mutagenesis.* 35: 206-221.

Tikenko-Holland N, Moore LE, Smith MT. Measurement and characterization of micronuclei in exfoliated human cells by fluorescence in situ hybridization with a centromeric probe. *Mutat. Res.*, 312 (1994) 39-50.

Tsunenori N, Hiroyuki H, Satomi N, Hirokazu T, Akira O. Mutagenicity of eluent by hot water extraction of various coals: Effect of chlorination. *Fuel* 87. 2008. 3132–3136.

Tuluze Y, Ozkol H, Koyuncu I, Ine H. Increased occupational coal dust toxicity in blood of central heating system workers. *Toxicol Ind Health.* 2011 Feb;27(1):57-64.

Ulker OC, Ustundag A, Duydu Y, Yucesoy B, Karakaya A. Cytogenetic monitoring of coal workers and patients with coal workers' pneumoconiosis in Turkey. *Environ Mol Mutagen.* 2008 Apr;49(3):232-7.

UPME. Unidad de Planeación Minero Energética. Plan de expansión de referencia generación – transmisión (Versión preliminar). 2005. Vol. 2019. 148 p. Disponible on line. Website: www.upme.gov.co.

Valverde M, Rojas E. Environmental and occupational biomonitoring using the Comet assay. *Mutat Res.* 2009 Jan-Feb;681(1):93-109.

Valverde M., Rojas E. Environmental and occupational biomonitoring using the Comet assay. *Mutation Research* 681 (2009) 93–109.

Wagner AJ, Bleckmann CA, Murdock RC, Schrand AM, Schlager JJ, Hussain SM. Cellular interaction of different forms of aluminum nanoparticles in rat alveolar macrophages. *J Phys Chem B.* 2007 Jun 28;111(25):7353-9.

Welge Peter, Marczynski Boleslaw, Raulf-Heimsoth Monika, Spickenheuer Anne, Kendzia Benjamin, Heinze Evelyn, Angerer Jürgen, U. Kä V erlein Heiko, Pesch Beate,

Brüning Thomas. Assessment of micronuclei in lymphocytes from workers exposed to vapours and aerosols of bitumen. Genotoxicity and carcinogenicity. 2011.

Wu Z, Du Y, Xue H, Wu Y, Zhou B. Aluminum induces neurodegeneration and its toxicity arises from increased iron accumulation and reactive oxygen species (ROS) production. *Neurobiol Aging*. 2010.

Yoneama María L., Ferraz Dias J. Espectroscopia por emissão de raios-x induzida por partículas (PIXE). Estudos ambientais em Candiota. Carvão e seus impactos. FEPAM. Porto Alegre-RS. 2004.

Zalacain M., Sierrasesúmaga L., Patiño A. El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos. 2005. *An. Sist. Navar, Vol 28. No 2 Mayo- Agost*.

Zhou HC, Zhong ZP, Jin BS, Huang YJ, Xiao R. Experimental study on the removal of PAHs using in-duct activated carbon injection. *Chemosphere*. 2005 May;59(6):861-9.

Zocche J. J, Leffa D. D, Damiani A. P, Carvalho F, Mendonca R.A , Iochims dos Santos C.E, Boufleur L.A, Dias J.F, de Andrade V.M, Heavy metals and DNA damage in blood cells of insectivore bats in coal mining areas of Catarinense coal basin, Brazil. *Environmental Research* 110. 2010. 684–691.

ANEXOS

CYP1A1, GSTM1 AND GSTT1 POLYMORPHISMS AND LACK OF MODULATION OF DNA DAMAGE IN OPEN-CAST COAL MINERS

Lyda Espitia-Pérez^{}, Milton Quintana Sosa[†], Grethel León-Mejía^{*}, Luz Stella Hoyos-Giraldo[‡], Juliana da Silva[§], Nubia Yandar[†], João A. P. Henriques^{*}*

^{*} Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

[†] Laboratorio de Investigación Biomédica y Biología Molecular, Montería, Córdoba, Colombia.

[‡] Department of Biology, Research Group Genetic Toxicology and Cytogenetics, Faculty of Natural Sciences and Education, Universidad del Cauca, Popayán, Cauca, Colombia.

[§] Curso de Biologia/Curso de Farmácia, Universidade Luterana do Brasil, ULBRA, Canoas, RS, Brazil.

Corresponding author:

E-mail address: pegas@cbiot.ufrgs.br (JAP. Henriques)

E-mail address: quintanaso@yahoo.com (M. Quintana).

KEYWORDS:

Open-cast coal mining, Micronucleus, Comet Assay, Occupational Risk, *CYP1A1*, *GSTM1*, *GSTT1*

Submetido à *Toxicology*.

ABSTRACT

Colombia has one of the world's largest coal reserves, being the fifth biggest thermal coal exporter world-wide. In open-cast coal mining extraction, large amounts of dust particles and heavy metals are released into the atmosphere, where they can form complex mixtures, a significant health risk to occupationally exposed workers. In addition, in open-cast mines, extracted coal is stored under sunlight, being an important source of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) emission after spontaneous and incomplete combustion. The aim of our study was to evaluate if the *CYP1A1* (*Msp1*), *GSTM1* (*null*) and *GSTT1* (*null*) polymorphisms could modify individual susceptibility to adverse coal exposure effects, considering the Micronucleus formation (MN) and DNA damage (Comet assay) as endpoints for genotoxicity.

The study population comprised 100 open-cast coal mining workers occupationally exposed and 100 non-exposed controls. The study was conducted in the coal mining area of "El Cerrejón", the world's largest open-cast coal mine, located in Guajira, Colombia.

The data show that polymorphisms in the metabolism genes *CYP1A1*, *GSTM1* and *GSTT1* had no impact on MN frequencies and DNA damage in peripheral lymphocytes of exposed workers. However, an increased relative risk (RR) related to an increased MN frequency was found in the exposed group, regardless of the genotypes. These findings suggest that coal exposure, but not *CYP1A1*, *GSTM1* and *GSTT1* polymorphisms, were associated with increased markers of DNA damage. To our knowledge, this study provides the first data in the country on a genotoxic hazard associated to exposure to coal residues by open-cast mining activities.

INTRODUCTION

In open-cast coal mines, activities such as coal stripping release large amounts of dust into the atmosphere. Coal dust is a tumorigenic agent in experimental animals and was shown to be equivocal tumorigenic agents associated with lymphomas and, at the higher dose, adrenal cortex tumors in rats exposed to either 6.6 or 14.9 mg/m³ for 6 hours/day intermittently for 86 weeks (NIOSH 1991). The American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH) considers the toxicity of coal dust with greater than 5 percent silica to be similar to quartz (ACGIH 1991). The abundance of different mineral chemical types in the El Cerrejon coal, determined by Computer-Controlled Scanning Electron Microscopy (CCSEM) revealed that over 80% by weight of the mineral matter is made up of clay minerals and quartz (Alsil, Si-alsil and Si-rich types (Irons, Quick et al. 2000). Exposure to quartz is causally related to silicosis and lung cancer. Statistically significant increases in the incidence of mortality from chronic bronchitis and pulmonary emphysema have been reported after exposure to quartz (Adamis and Williams 2005). Although quartz and asbestos are the most hazardous minerals to human health identified to date, clay minerals may be dangerous because of their limited solubility in the lung, reactivity, small particle size, and fibrous morphology (Soukup 2007).

In addition, particularly in open-cast mines from north Colombia, extracted coal is stored under the sunlight at high ambient temperatures, where spontaneous and incomplete coal combustion may result in PHAs emission (Liu, Niu et al. 2008), most of which exhibit well-known mutagenic and carcinogenic activity. During coal extraction processes, a large number of these compounds are released in the atmosphere, where they can form complex mixtures (Gibson 1979). Such mixtures represent one of the most important health and safety hazards to this industry's workers, due to potential synergistic effects of the resulting combinations (White 2002).

Several reports have been published on the adverse effects of coal mine residues on health, like lung cancer and other respiratory disorders (Zhang, Dai et al. 2002), and a number of studies have been conducted to provide evidence of genotoxic effects by coal dust residues in occupationally exposed workers (Donbak, RencuzogullarI et al. 2005). However, most of these studies address exposure to underground coal deposits, while the potential genotoxic effects, generated by open-cast coal mining systems, remain unexplored.

Recently, increased attention has been drawn to genetic polymorphisms in humans which seem to modulate the genotoxic response to environmental and occupational exposures. Genetic susceptibility might be a consequence of variations in genes encoding for carcinogen or xenobiotic-metabolizing enzymes, such as cytochrome P-450 (*CYP*) in Phase I and glutathione S-transferases (*GST*) in Phase II (Garte, Taioli et al. 2007). *CYP* and *GST* genes play an important role in the activation and detoxification, respectively, of a wide range of human carcinogens, including several residues as PAHs and particulate matter from coal mining activities (Hosgood, Berndt et al. 2007). Through metabolism, the complex mixture compounds in coal particulate matter can be bio-transformed into DNA-damaging agents and genetic variations in metabolizing enzymes may influence the response as observed by assessing cytogenetic biomarkers (Sram, Beskid et al. 2007). The *CYP1A1*_{Msp1}, *GSTM1*_(null) and *GSTT1*_(null) polymorphisms have been linked to an increased activation or to poor detoxification, and have been associated with certain cancers and lung diseases risk (Pavanello, Pulliero et al. 2005).

Colombia has one of the world's largest coal reserves and open-cast mine, being the fifth biggest thermal coal exporter world-wide. "El Cerrejón", located northwest of the country, is the biggest open-cast coal mine world-wide, and concentrates most of the mining sector country's workers. In a recent study, we found an increased rate of MN frequency (cytokinesis-blocked Micronucleus assay) and DNA damage (Comet assay) in peripheral lymphocytes of coal workers (León-Mejía, Espitia-Pérez et al. 2011). In

this scenario, the aim of the present molecular epidemiology (cross-sectional) study was to evaluate if the *CYP1A1(Msp1)*, *GSTM1 (null)* and *GSTT1 (null)* polymorphisms could have an influence on the individual susceptibility to coal exposure, as demonstrated by MN formation and primary DNA damage in lymphocytes of exposed workers. Our results will contribute to the understanding and discussion of a potential genotoxic hazard resulting from occupational exposure due to open-cast coal mining activities, taking into account biomarkers of genetic polymorphisms regarding metabolizing enzymes. To our knowledge, this study also provides the first data in the country on a genotoxic hazard associated to exposure to coal residues by open-cast mining activities.

METHODS

Study population and sample collection

This study was approved by the Committee on Research Ethics of each institution and a written informed consent was obtained from each individual before sample collection. The study population included a total of 200 healthy males. To calculate the size of the sample was considered the minimum necessary to be detected at least 1% of the genetic polymorphism less frequent in the studied population. A group of 100 exposed males from “El Cerrejon” open-cast mine engaged in surface activities, who were exposed to coal dust for at least 5 years was investigated. The non-exposed control group consisted of 100 males with no known exposure to genotoxic agents such as coal dust, radiation, chemicals, cigarette, etc., and was selected from the general local population. Exposed workers were matched to non-exposed controls by age (± 2 years) and similar social-economic status. Confounding and exclusion factors were collected from all participants who responded to an interviewer-administered, detailed and standard questionnaire which included data on lifestyle, health status, cancer history, other chronic diseases, nutrition and smoking habits, alcohol and medication intake, occupational and time exposure, adoption of protective measurements, and previous exposure to medical X-rays or treatment with known carcinogens. Exclusion criteria for exposed and non-exposed control groups were age over 60 years or less than 18 years, current and previous smoking habits, medical treatment for up to 3 months or X-ray up to 1 year before sampling, as well as therapeutic drugs intake, known to be genotoxic, mutagenic or carcinogenetic. All data were structured and maintained in databases. No major differences in social-economic status and dietary habits were recorded. The whole study population was informed about the aim, benefits, risks and methodology details of the study through the informed consent.

Blood Samples Collection

Peripheral blood samples were collected by venipuncture from all 200 participants: 20 mL of blood in heparin tubes (Becton Dickenson, vacutainer), 10 mL for the MN assay and 10 mL for the Comet Assay, and 10 mL of blood were collected in EDTA coated tubes for the DNA isolation and genotyping. Blood sampling was conducted by personnel with medical training. All blood samples tubes were coded and kept upright at room temperature in the dark during the transportation (overnight) to the laboratory, where the samples were processed immediately upon arrival. Blood sampling was carried out from June 2009 to January 2010.

Micronucleus Assay

Heparinized whole blood (0.5 mL) was added to 4.5 mL of RPMI 1640 medium (Sigma R8758, USA) supplemented with 2 mM l-glutamine (Sigma A5955, USA), 10% fetal bovine serum (Gibco/Invitrogen 15000-044, Brazil), 100 µL/mL antibiotic-antimycotic (Sigma A5955, USA) and 2% phytohemagglutinin (Sigma L8754, USA) to stimulate lymphocytes. Cultures were incubated at 37 °C in the dark for 44 h, under 5% CO₂ in a humidified atmosphere. Two parallel cultures were set up in tubes (Falcon 3033) for each sample. Cytocalasin B (Sigma, C6762) was added at the 44th h of incubation to a final concentration of 6 µg/mL. The cells were harvested 72 h after the beginning of incubation, treated with hypotonic solution (0.075 M KCl) and fixed with methanol/acetic acid (3:1), immediately centrifuged and re-fixed three times. The fixed cells were dropped onto humidified slides, air dried and stained in a 10% (v/v) solution of Giemsa for 10 min. Two thousand binucleated cells (BN) per individual (1000 BN per culture) were recorded. All coded slides were analyzed using an optical light microscope (40x magnification). All slides were scored by one reader blinded for the status of the subjects. The scoring criteria followed those proposed by Fenech *et al* (2003).

Comet Assay Test

The alkaline Comet assay was performed as described by Singh *et al.*,(1988) with the modifications suggested by da Silva *et al.*, (2000; 2000) for field work. Thirty microliters of isolated lymphocytes - Histopaque 1077 were mixed with 270 μ L 0.5% of low melting point (LMA-Invitrogen) at 37°C. This mixture was placed on a slide previously coated with 1.5% of normal melting point agarose (NMA-Cambrex Bioscience Rockland) processed at 60 °C. The agarose layers were covered with a cover slip and after gel solidified the cover slips were removed. The slides were immersed overnight in lysis solution (2.5M NaCl, 100mM EDTA and 10mM Tris, pH 10.0–10.5, 1% with freshly added 1% Triton X-100 and 10% DMSO) at 4 °C in the dark. Afterwards, the slides were placed for 30 min in alkaline buffer at 4 °C (300mM NaOH and 1mM EDTA, pH > 13) to unwind DNA. Alkaline electrophoresis was carried out for 30 min at 25V and 300 mA. This standard alkaline procedure allows single-strand DNA breaks to be detected. Also, alkali labile lesions (i.e., apurinic/apirimidinic sites) are converted to strand breaks under these conditions. Gels were neutralized by washing with 0.4M Tris (pH 7.5), 3 times, 5 min each wash. Finally, the slides were stained with 60 μ L ethidium bromide (2 μ L/mL) and examined at 40X magnification under a fluorescence microscope equipped with a green filter of 540 nm. Direct light exposure of the samples was avoided during the whole process. For each subject we analyzed 100 randomly selected comets (50 cells from each of two replicate slides) evaluated in parallel by visual scoring and by computer image analysis using Comet Assay IV® (Perceptive Instruments) software.

Three parameters were evaluated: (i) damage index (DI), in which each cell was designated to one of five classes (from no damage = 0 to maximum damage = 4) according to tail size and shape (Collins 2004). The values obtained for each individuals could range from 0 (0x100) to 400 (4x100) (ii) damage frequency (DF), calculated as the percentage of damaged cells, and (iii) percentage of DNA in the tail (Tail % DNA). The Tail % DNA gives a clear indication of the appearance of the

comets and, in addition is linearly related to the DNA break frequency over a wide range of levels of damage (Hartmann, Agurell et al. 2003).

DNA isolation and xenobiotic- metabolizing enzymes genetic polymorphisms

For each 10 mL of blood sample collected in EDTA coated tube, buffy coat containing peripheral blood mononuclear cells (PBMC) was isolated according to the Ficoll–Histopaque method. PBMC were digested with proteinase-K. Genomic DNA was isolated from PBMC by means of commercially available DNeasy Blood and Tissue® extraction kit (Qiagen, USA), according to the manufacturer’s instructions. Each DNA sample was stored at –20 °C until analysis.

The *CYP1A1* polymorphism, a T-to-C transition in base pair 264 downstream the poly(A) signal, which creates an *MspI* restriction site (*m2* allele), was identified by Polymerase chain reaction (PCR) and Restriction Fragment Length Analysis (RFLP) techniques according to Lum and Le Marchand (1998). The *CYP1A1* RFLP was carried out using the *MspI* endonuclease, whose restriction site polymorphism resulted in three genotypes: a homozygous *m1* allele without *MspI* site (unique 340 bp fragment), the heterozygote (340, 200 and 140 bp fragments) and a rare homozygous *m2* allele with the *MspI* site (200 and 140 bp fragments), as shown in Figure 1.

The genotyping of *GSTM1* and *GSTT1*, which detects homozygous deleted genes that results in deficiency of the *GSTM1/T1* activity, was carried out by allele-specific multiplex PCR as described earlier by Abdel-Rahman *et al.*, (1996) , using *CYP1A1* gene amplification as an internal control. Both PCRs, *CYP1A1* and *GSTM1* and *T1*, were carried out using appropriate primers using approximately 50 ng of DNA. The *GSTM1* and *GSTT1* genotypes were classified as null or positive (at least one undeleted allele). All the resulting bands were separated in agarose gels by electrophoresis and visualized with ethidium bromide staining (10 mg/ml) and ultraviolet transillumination. The presence or absence of *GSTM1* and *GSTT1* genes was detected by the presence or absence of a band at 480 bp (corresponding to *GSTT1*) and a band

at 215 bp (corresponding to *GSTM1*). A band at 312 bp (corresponding to *CYP1A1* gene) was always present (Figure 2).

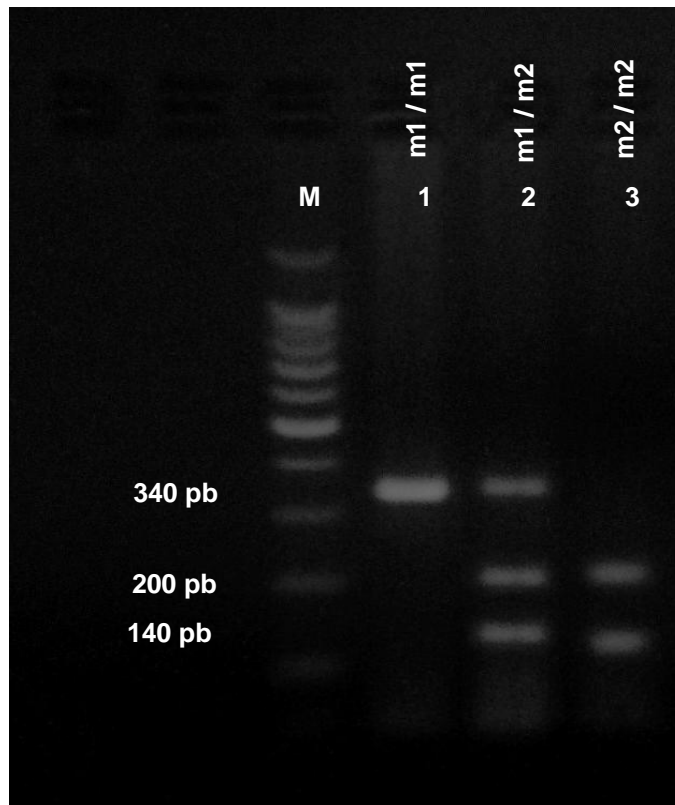


Figure 1. PCR-RFLP analysis for the presence/absence of the CYP1A1*MspI* polymorphism: Lane 1 a homozygous individual (*m1* allele without *MspI* site 340 bp fragment), Lane 2 heterozygote individual (*m1/m2* 340, 200 and 140 bp fragments) and in Lane 3 homozygous individual (*m2* allele with the *MspI* site) generates 200 and 140 bp fragments. M-Ladder marker

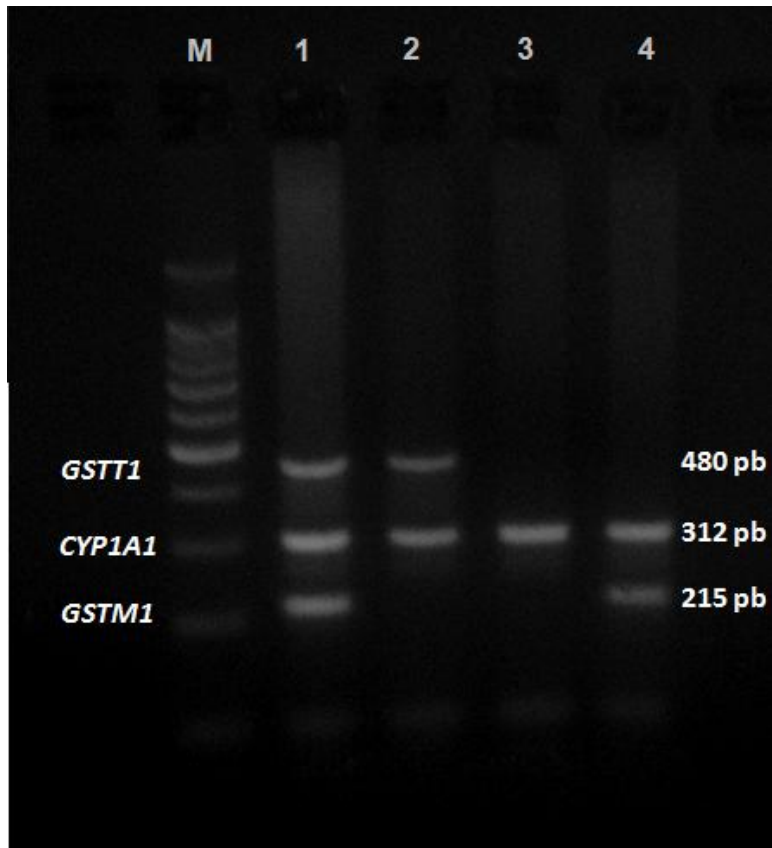


Figure 2. Multiplex PCR products for the presence/absence of *GSTM1* and *GSTT1*: Lane 1: *GSTM1/T1* positive; Lane 2: *GSTM1* null, *GSTT1* positive; Lane 3: *GSTM1/T1* null; Lane 4: *GSTM1* positive, *GSTT1* null. Band at 312 bp corresponds to the internal control (*CYP1A1* gene fragment). The presence or absence of *GSTM1* and *GSTT1* genes was detected by the presence or absence of a band at 480 bp (corresponding to *GSTT1*) and a band at 215 bp (corresponding to *GSTM1*).

Statistical analysis

Statistical analyses were carried out using SPSS 10.0.7 package (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA). The Hardy–Weinberg equilibrium test for *CYP1A1* genotype and *GSTM1* and *GSTT1* genotypes between groups was performed using a χ^2 test with 1 degree of freedom. Differences in qualitative variables, MN frequency and Comet Assay parameters between exposed workers and non-exposed control groups were calculated using χ^2 test and the non-parametric Mann–Whitney rank sum U-test, respectively. The association between ageing and MN frequency, and time of exposure and MN frequency in the whole study population, exposed and non-exposed controls groups was assessed using the Spearman’s rank correlation test. The Pearson’s χ^2 was used to evaluate differences in the distributions of allele frequencies between exposed and non-exposed control subjects. For all genes, the heterozygous and homozygous carriers of the polymorphism were classified as polymorphic genotypes and were combined in the statistical analysis, due to the small numbers of homozygote variants. The relative risk (RR) and 95% confidence intervals (95% CI) were obtained from the Poisson regression analysis to evaluate the association between MN frequency and the metabolism genes (*CYP1A1MspI*, *GSTM1_{null}* and *GSTT1_{null}*) polymorphisms. Statistical significance was set at $p < 0.05$ (α) with power (β) at ≥ 0.8 .

RESULTS

A slight exposure-dependent increase of micronucleus frequency was observed (Data not shown), despite of Spearman correlation coefficients did not reveal a significant association between years of work and MN frequency ($r = 0.0078$ ($p = 0.38$) or Comet assay parameters ($p > 0.05$). No association was found between age and any genotoxic endpoint ($p > 0.05$).

All individuals in this study were intentionally selected to be non-smokers or former smokers in order to eliminate confounding factors, such as cigarette smoking. The correlation between age and MN frequency was not statistically significant for the whole study population. Detailed demographic characteristics of the studied population can be found in León-Mejía *et al.*, (2011).

The allele/genotype frequencies of CYP1A1, *GSTM1* and *GSTT1* studied for the non-exposed control and exposed groups are shown in Table 1. All genotypes were according to the Hardy–Weinberg equilibrium, making selection bias less likely ($p > 0.05$). All variant alleles were in agreement with literature values for Caucasian population (Garte 2001). The Poisson regression analysis of individual genotypes for the xenobiotic-metabolism genes and relative risk in association with MN frequencies was evaluated in non-exposed controls and exposed individuals (Table 2). The RR was calculated using the wild genotype as reference (lower risk genotype). There was a significant MN frequency increase in exposed workers (RR 2.88, 95% CI 2.525 – 3.284, $p < 0.001$), representing a higher risk in relation to the matched non-exposed control. However, none of the xenobiotic-metabolism genotypes did significantly influence the MN frequency.

The analysis of Comet assay values indicated a significant increase in the Damage Index, Damage Frequency and Tail % DNA ($p < 0.001$) in the exposed group, in comparison to the non-exposed control group (Mann–Whitney U-test) (59.97 ± 39.59 vs 8.69 ± 6.42 , 40.92 ± 23.58 vs 7.31 ± 5.09 and 13.12 ± 7.98 vs 2.90 ± 1.54) (Table 3). Table 3 also shows the effect of individual genotype on the level of different Comet

assay parameters evaluated in non-exposed (control) and exposed groups. No statistically significant effects of *CYP1A1*, *GSTM1* and *GSTT1* variants were obtained in the Comet assay or the MN test for the exposed group.

Table 1. Distribution of *CYP1A1*, *GSTM1* and *GSTT1* genotypes and variant alleles frequencies in non-exposed control and exposed groups.

Gene	Genotype	Non-exposed control group n=100 (%)	Exposed group n=100 (%)	Total n=200 (%)	Allele/Genotype Frequency	p-value ^a
<i>CYP1A1 MspI</i>	<i>m1/m1</i>	49 (49)	38 (38)	87 (43,5)	<i>m1</i> : 0,65 <i>m2</i> : 0,35	>0,25
	<i>m1/m2</i>	40 (40)	47 (47)	87 (43,5)		
	<i>m2/m2</i>	11 (11)	15 (15)	26 (13)		
<i>GSTM1</i>	<i>Positive</i>	58 (58)	59 (59)	117 (58,5)	<i>Positive</i> : 0,59 <i>Null</i> : 0,41	>0,75
	<i>Null</i>	42 (42)	41 (41)	83 (41,5)		
<i>GSTT1</i>	<i>Positive</i>	80 (80)	80 (80)	160 (80)	<i>Positive</i> : 0,8 <i>Null</i> : 0,2	1
	<i>Null</i>	20 (20)	20 (20)	40 (20)		

^aDetermined by χ^2 test

Table 2. Poisson regression analysis of Micronucleus: Effect of individual genotype in non-exposed control and coal open-cast mining residues exposed groups.

Gene	Genotype	Exposure	MN frequency ^a (mean ± S.D ^b)	Relative Risk (RR)	95% CI ^d	p-value ^e	
<i>CYP1A1 Msp1</i>	-	Non-exposed	2,97 ± 4,01	-	-	-	
		Exposed	8,56 ± 4,78	2,88	2,525 – 3,284	<0,001	
	<i>m1/m1</i>	Non-exposed	2,469 ± 4,417	Reference ^c	-	-	
		<i>m1/m2, m2/m2</i>	Non-exposed	3,451 ± 4,413	1,397	1,107 – 1,761	<0,001
			Exposed	8,816 ± 4,413	3,564	2,826 – 4,494	<0,001
		<i>m1/m2, m2/m2</i>	Exposed	8,403 ± 4,417	3,400	2,696 – 4,287	<0,001
<i>GSTM1</i>	<i>Positive</i>	Non-exposed	3,53 ± 4,409	Reference ^d	-	-	
		Non-exposed	2,19 ± 4,406	0,619	0,469 – 0,816	0,001	
	<i>Null</i>	Exposed	8,424 ± 4,408	2,374	1,799 – 3,132	<0,001	
		Exposed	8,756 ± 4,405	2,466	1,869 – 3,253	<0,001	
	<i>Positive</i>	Non-exposed	2,838 ± 4,409	Reference ^d	-	-	
		Non-exposed	3,500 ± 4,409	1,232	0,98 – 1,540	0,091	
<i>GSTT1</i>	<i>Positive</i>	Exposed	8,863 ± 4,409	2,531	2,024 – 3,164	<0,001	
		Exposed	7,350 ± 4,409	2,588	2,069 – 3,236	<0,001	

^a Values of the biomarker (MN frequency) of the entire group (Exposed or Non-exposed) before subset for each genotype from León-Mejía et al. (2011)

^b S.D.: standard deviation

^c Reference: calculated using the wild genotype as reference (lower risk genotype).

^d CI: confidence interval

^e Poisson regression analysis p < 0.05

Table 3. Effect of individual genotype on Comet assay parameters in non-exposed and coal open-cast mining residues exposed groups (mean and standard deviation).

Gene	Genotypes	Exposure	Comet Assay Parameters ^a		
			Damage Index DI (n)	Damage Frequency DF (n)	Tail % DNA (n)
-	-	Non-exposed	8,69 ± 6,42 (100)	7,31 ± 5,09 (100)	2.90 ± 1.54 (100)
		Exposed	59,97 ± 39,59 (100)*	40,92 ± 23,58 (100)*	13.12 ± 7.98 (100)*
<i>CYP1A1 MspI</i>	<i>m1/m1</i>	Non-exposed	9,00 ± 6,48 (49)	7,27 ± 5,33 (49)	2.87 ± 1.57 (49)
	<i>m1/m2, m2/m2</i>	Non-exposed	9,00 ± 6,41 (51)	7,35 ± 4,96 (51)	2.94 ± 1.51 (51)
	<i>m1/m1</i>	Exposed	57,00 ± 38,20 (38)	40,24 ± 23,16 (38)	12.34 ± 7.85 (38)
	<i>m1/m2, m2/m2</i>	Exposed	62,00 ± 40,63 (62)	41,34 ± 24,01 (62)	13.61 ± 8.08 (62)
	<i>Positive</i>	Non-exposed	8,00 ± 5,82 (58)	7,19 ± 4,97 (58)	2.78 ± 1.46 (58)
<i>GSTM1</i>	<i>Null</i>	Non-exposed	9,00 ± 7,21 (42)	7,48 ± 5,36 (42)	3.08 ± 1.64 (42)
	<i>Positive</i>	Exposed	57,00 ± 38,10 (59)	38,85 ± 22,87 (59)	12.43 ± 8.07 (59)
	<i>Null</i>	Exposed	65,00 ± 41,65 (41)	43,90 ± 24,83 (41)	14.12 ± 8.65 (41)
	<i>Positive</i>	Non-exposed	8,00 ± 6,26 (80)	7,21 ± 5,18 (80)	2.81 ± 1.45 (80)
<i>GSTT1</i>	<i>Null</i>	Non-exposed	10,00 ± 7,09 (20)	7,70 ± 4,96 (20)	3.3 ± 1.83 (20)
	<i>Positive</i>	Exposed	58,00 ± 41,09 (80)	39,76 ± 24,37 (80)	12.70 ± 8.29 (80)
	<i>Null</i>	Exposed	69,00 ± 32,38 (20)	45,55 ± 20,69 (20)	14.82 ± 6.52 (20)

^a Values of the biomarker (DI, DF and Tail % DNA) of the entire group (Exposed or Non-exposed) before subset for each genotype from León-Mejía et al. (2011)

*p <0.001 in relation to non-exposed group, Mann-Whitney U Test.

DISCUSSION

Considering all sources of fossil energy, coal mining has been described as the activity with the most significant release of pollutants of different kinds, like PHAs and metals. Once released into the atmosphere, these substances can form complex mixtures (Gibson 1979), representing one of the most important occupational health and safety risks due to potential synergistic effects (White 2002).

In a recent study, we found an elevated MN frequency rate (cytokinesis-blocked Micronucleus assay) and DNA damage (Comet assay) in coal workers from an open-cast mine (León-Mejía, Espitia-Pérez et al. 2011). Our results showed an increase in MN frequency in exposed workers, which is consistent with previous cross-sectional studies in workers occupationally exposed to coal residues through transportation of waste coal ash for disposal (Celik, Donbak et al. 2007).

A slight exposure-dependent increase of micronucleus frequency was observed, although with no significant association between years of work and MN frequency or Comet assay parameters. The same results have been obtained for several studies involving populations of coke oven workers (Qiu, Leng et al. 2007) and populations exposed to PAH (Kubiak, Belowski et al. 1999). This lack of significant association can be possibly explained if we consider that the exposure levels of each individual are uneven, depending of exposure conditions in each coal mining area, as we described in León-Mejía et al., (2011).

Considerable evidence has suggested that ROS and their products are involved in the pathogenesis of lung disorders and cancer risk in exposed subjects (Schins and Borm 1999). Reactive oxygen species (ROS) may be produced by alveolar macrophages and epithelial cells in response to coal and iron dust stimulation by means of the Fenton reaction (Dalal, Newman et al. 1995). The excessive production of ROS may increase oxidative stress resulting in DNA damage, lipid peroxidation, protein modification, membrane disruption, and mitochondrial damage (Zhai, Liu et al. 2002), all capable of

affecting cytogenetic and genetic damage levels. Besides this, quartz appears to be an important genotoxic contaminant in the complex mixtures of fibrogenic respirable airborne particles of ambient air in the following workplaces: quarrying and stone processing (where the respirable dust concentration is 0.18 – 2.16 mg/m, and quartz represents 30% of the dust); and coal mines (where the average respirable dust concentration is 2.68 mg/m and the quartz-containing dust is 3% or lower) (Dobiáš 2006). A Computer-Controlled Scanning Electron Microscopy (CCSEM) analysis revealed that over 80% by weight of the mineral matter of Cerrejon coals is made up of clay minerals and quartz (Alsil, Si-alsil and Si-rich types (Irons, Quick et al. 2000). An important determinant of the toxicity of clays is the content of quartz (Adamis and Williams 2005). Exposure to quartz is causally related to silicosis and lung cancer and clay minerals may be dangerous because of their limited solubility in the lung, reactivity, small particle size, and fibrous morphology (Soukup 2007).

Biotransformation plays an important role in the carcinogenic activity of environmental carcinogens. Large inter-individual variation in the biotransformation has been reported, and genetic polymorphisms in some xenobiotic-metabolizing enzymes can in part explain some of these differences. Thus in the present study we evaluated the modulation effect of xenobiotic-metabolizing enzymes polymorphisms *CYP1A1*, *GSTM1* and *GSTT1* on DNA damage response to coal dust exposure. The *CYP1A1* gene encodes for an extra-hepatic enzyme aryl-hydrocarbon hydroxylase, which participates in the activation and detoxification of xenobiotics and various carcinogens, like PAHs and ROS (Kvitko, Nunes JC et al. 2000). The *CYP1A1* variant genotype has been found to be associated with higher DNA adducts levels in coke oven workers (Kuljukka-Rabb, Nylund et al. 2002), and increased Comet assay tail inertias in pot-room workers (Godderis, Aka et al. 2006). However, in our study we did not find any relation between *CYP1A1* variants and MN frequencies and DNA damage (Comet assay) increase in the exposed group. Similar MN frequencies results were found in a study that analyzed the two metabolic genotypes *CYP1A1* (*MspI* and *Ile/Val* sites) in coke-oven workers (Brescia, Celotti et al. 1999), and in other studies

that investigated *MspI* polymorphism and risk assessment in other occupational settings (Villarini, Moretti et al. 2008).

Some of the mechanisms that provide protection against oxidative damage by carcinogens in human cells involve detoxification enzymes such as glutathione S-transferase-mu (*GSTM*), and glutathione S-transferase-theta (*GSTT1*). Given the importance of *GSTs* in the detoxification of electrophilic carcinogens, the null genotypes of both genes have become the object of molecular epidemiology studies because homozygous deletions are expected to result in an impaired ability to detoxify carcinogenic compounds. In our study, the MN frequency and DNA damage (Comet assay) from exposed workers were not influenced by null polymorphisms in these xenobiotic-metabolism genes. In several studies, the null polymorphisms in *GSTM1* and *GSTT1* have been widely studied in relation to genotoxic agents exposure, but the results are still inconsistent and conflicting (Iarmarcovai, Botta et al. 2007). Others studies have also failed to demonstrate the association between genotype and DNA damage response due to occupational exposure to coal mining residues (Yucesoy, Johnson et al. 2005). Besides this, a recent pooled analysis revealed that the influence of *GSTs* genotypes in MN frequencies was statistically significant only in two of the eight studies and only for *GSTM1* (Kirsch-Volders, Mateuca et al. 2006), which have demonstrated that the MN frequency increase does not depend in most cases of xenobiotic-metabolism or DNA repair genes polymorphisms (Mateuca, Aka et al. 2005).

The correlations between age and time of exposure with MN frequency and DNA damage (Comet assay), were not significant for exposed and non-exposed control groups. These results agree with those reported by Grover et al.,(2010) and contrarily to previous studies that detected an overall increase in MN frequency with age and gender, being more pronounced in occupationally exposed females as compared with exposed males (Kirsch-Volders, Mateuca et al. 2006). Regarding exposure time in relation to MN frequency and DNA damage levels, several studies have found a relationship between duration of employment and damage levels. This was observed

assessing different endpoints, including MN and Comet assay parameters, in other occupational settings (Minozzo, Deimling et al. 2010). However, data for coal mining occupational time of exposure details are limited and contradictory, which requires more studies in coal exposed populations to provide more insight into occupational hazards resulting from exposure to coal dust.

In this context, larger sample sizes may increase sensitivity of data in further studies, consolidating statistical power in the stratification of the statistical analysis. Similarly, the underlying mechanisms for MN formation may be more reliably elucidated regarding type (whether clastogenic or aneugenic), providing more insight into potential associations between polymorphisms and MN formation. Also, it would be interesting to include other susceptibility biomarkers in other xenobiotic-metabolizing and DNA repair genes, which should better inform on mechanisms and biological significance of results.

In conclusion, the present study suggests that occupational exposure to coal residues is associated with chromosome damage potentially indicating an increased susceptibility for cancer formation; In our study, endpoints of genotoxic insult were not influenced by xenobiotic-metabolizing genes polymorphisms. Limited information is available on *CYP1A1*, *GSTM1* and *GSTT1* polymorphisms in the Colombian population and their potential modulatory effects on cytogenetic biomarkers in exposed populations. This study contributes to establishing a map of representative genotype frequencies in the Latin-American population, which is quite complex given the high degree of ethnic admixture and stratification.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by COLCIENCIAS grant [313/128340820478/2007]. We really appreciate to Ingrid Reyes, Shirley Salcedo, Victoria Jaramillo, Jorge Galeano, and Jaime Luna for their invaluable contribution and Luisa Escobar and Dra Temenouga Guecheva for their English review.

REFERENCIAS

- Abdel-Rahman, S. Z., R. A. El-Zein, et al. (1996). "A multiplex PCR procedure for polymorphic analysis of GSTM1 and GSTT1 genes in population studies." Cancer Letters **107**(2): 229-233.
- ACGIH (1991). Documentation of the threshold limit values and biological exposure indices. Documentation of the threshold limit values and biological exposure indices. Cincinnati, OH, American Conference of Governmental Industrial Hygienists. .
- Adamis, Z. n. and R. Williams (2005). Environmental Health Criteria 231 Bentonite, Kaolin and selected clay minerals. W. W. H. Organization. Geneva, WHO World Health Organization. **1**: 175.
- Brescia, G., L. Celotti, et al. (1999). "The influence of cytochrome P450 1A1 and glutathione S-transferase M1 genotypes on biomarker levels in coke-oven workers." Archives of Toxicology **73**(8): 431-439.
- Celik, M., L. Donbak, et al. (2007). "Cytogenetic damage in workers from a coal-fired power plant." Mutat. Res., Genet. Toxicol. Environ. Mutagen. **627**(2): 158-163.
- Collins, A. (2004). "The comet assay for DNA damage and repair." Molecular Biotechnology **26**(3): 249-261.
- da Silva, J., T. R. O. de Freitas, et al. (2000). "Genotoxicity biomonitoring in coal regions using wild rodent *Ctenomys torquatus* by Comet assay and micronucleus test." Environmental and Molecular Mutagenesis **35**(4): 270-278.

- Dalal, N. S., J. Newman, et al. (1995). "Hydroxyl radical generation by coal mine dust: Possible implication to coal workers' pneumoconiosis (CWP)." Free Radical Biology and Medicine **18**(1): 11-20.
- Dobiáš, L., Lehocká, Hana, Závacká, Ivona , Kůsová Jaromira, Adamus Tomas and Tomášková Hana (2006). The Carcinogenic Risk of Occupational Exposure to Quartz Dust: Biomonitoring Results. Environmental Health in Central and Eastern Europe. L. H. Cizmas and A. Tomas, Springer Netherlands. **1**: 111-114.
- Donbak, L., E. Rencuzogullari, et al. (2005). "The genotoxic risk of underground coal miners from Turkey." Mutat. Res., Genet. Toxicol. Environ. Mutagen. **588**(2): 82-87.
- Fenech, M., W. P. Chang, et al. (2003). "HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures." Mutat. Res., Genet. Toxicol. Environ. Mutagen. **534**(1-2): 65-75.
- Garte, S. (2001). "Metabolic Susceptibility Genes As Cancer Risk Factors Time for a Reassessment?" Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **10**: 1233-1237.
- Garte, S., E. Taioli, et al. (2007). "Effects of metabolic genotypes on intermediary biomarkers in subjects exposed to PAHS: Results from the EXPAH study." Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen. **620**(1-2): 7-15.
- Gibson, J. (1979). Coal - an introduction to its formation and properties. . Coal and Modern Coal Processing: An Introduction M. G. Pitt GJ. New York, Academic Press. **2**: 1-25.

- Godderis, L., P. Aka, et al. (2006). "Dose-dependent influence of genetic polymorphisms on DNA damage induced by styrene oxide, ethylene oxide and gamma-radiation." Toxicology **219**(1-3): 220-229.
- Grover, P., P. V. Rekhadevi, et al. (2010). "Genotoxicity evaluation in workers occupationally exposed to lead." International Journal of Hygiene and Environmental Health **213**(2): 99-106.
- Hartmann, A., E. Agurell, et al. (2003). "Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay." Mutagenesis **18**(1): 45-51.
- Hosgood, H. D., S. I. Berndt, et al. (2007). "GST genotypes and lung cancer susceptibility in Asian populations with indoor air pollution exposures: A meta-analysis." Mutat Res Rev Mutat Res **636**(1-3): 134-143.
- Iarmarcovai, G., A. Botta, et al. (2007). "Micronuclei and genetic polymorphisms: from exposure to susceptibility." Annales De Biologie Clinique **65**(4): 357-363.
- Irons, R. M. A., W. Quick, et al. (2000). The fate of trace elements in pulverised fuel (PF) combustion systems, PowerGen UK plc, CRE Group Ltd, University of Nottingham. **R193**.
- Kirsch-Volders, M., R. A. Mateuca, et al. (2006). "The effects of GSTM1 and GSTT1 polymorphisms on micronucleus frequencies in human lymphocytes in vivo." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **15**(5): 1038-42.
- Kubiak, R., J. Belowski, et al. (1999). "Biomarkers of carcinogenesis in humans exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons." Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis **445**(2): 175-180.
- Kuljukka-Rabb, T., L. Nylund, et al. (2002). "The effect of relevant genotypes on PAH exposure-related biomarkers." J Expo Anal Environ Epidemiol **12**(1): 81-91.

- Kvitko, Nunes JC, et al. (2000). "Cytochrome P4501A1 polymorphisms in South American Indians." Hum Biol **72**(6): 1039-43.
- León-Mejía, G., L. Espitia-Pérez, et al. (2011). "Assessment of DNA damage in coal open-cast mining workers using the cytokinesis-blocked micronucleus test and the comet assay." Science of the Total Environment **409**: 686-691.
- Liu, G., Z. Niu, et al. (2008). "Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from coal combustion: emissions, analysis, and toxicology." Rev Environ Contam Toxicol. **192**: 1-28.
- Lum, A. and L. Le Marchand (1998). "A simple mouthwash method for obtaining genomic DNA in molecular epidemiological studies." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **7**(8): 719-724.
- Mateuca, R., P. V. Aka, et al. (2005). "Influence of hOGG1, XRCC1 and XRCC3 genotypes on biomarkers of genotoxicity in workers exposed to cobalt or hard metal dusts." Toxicology Letters **156**(2): 277-288.
- Minozzo, R., L. I. Deimling, et al. (2010). "Cytokinesis-blocked micronucleus cytome and comet assays in peripheral blood lymphocytes of workers exposed to lead considering folate and vitamin B12 status." Mutation Research **697**(1-2): 24-32.
- NIOSH (1991). National Institute for Occupational Safety and Health - Registry of toxic effects of chemical substances: Coal, ground bituminous. . P. H. S. U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control, National Institute for Occupational Safety and Health, Division of Standards Development and Technology Transfer, Technical Information Branch. . Cincinnati, OH.

- Pavanello, S., A. Pulliero, et al. (2005). "Reduced nucleotide excision repair and GSTM1-null genotypes influence anti-B[a]PDE-DNA adduct levels in mononuclear white blood cells of highly PAH-exposed coke oven workers." Carcinogenesis **26**(1): 169-175.
- Qiu, L., S. Leng, et al. (2007). "Path analysis of biomarkers of exposure and early biological effects among coke-oven workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons." Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention **16**(6): 1193-9.
- Schins, R. and P. Borm (1999). "Mechanisms and Mediators in Coal Dust Induced Toxicity: A Review." Ann. Occup. Hyg. **32**(1): 7 - 33.
- Singh, N. P., M. T. McCoy, et al. (1988). "A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells." Experimental Cell Research **175**(1): 184-191.
- Soukup, D., Buck, Brenda, Goossens, Dirk ,Teng, Yuanxin and Baron, Dirk (2007). Chapter 8: Mineralogical Composition. Mineralogical composition of soil samples in the Nellis dune recreation area.
- Sram, R. J., O. Beskid, et al. (2007). "Chromosomal aberrations in environmentally exposed population in relation to metabolic and DNA repair genes polymorphisms." Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen. **620**(1-2): 22-33.
- Tice, R. R., E. Agurell, et al. (2000). "Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing." Environ Mol Mutagen **35**(3): 206-21.
- Villarini, M., M. Moretti, et al. (2008). "Evaluation of Primary DNA Damage, Cytogenetic Biomarkers and Genetic Polymorphisms for CYP1A1 and GSTM1 in

Road Tunnel Construction Workers." J. Toxicol. Environ. Health A **71**(21): 1430 - 1439.

White, P. A. (2002). "The genotoxicity of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in complex mixtures." Mutat Res Rev Mutat Res **515**(1-2): 85-98.

Yucesoy, B., V. J. Johnson, et al. (2005). "Lack of association between antioxidant gene polymorphisms and progressive massive fibrosis in coal miners." Thorax **60**(6): 492-495.

Zhai, R., G. Liu, et al. (2002). "Genetic Polymorphisms of MnSOD, GSTM1, GSTT1, and OGG1 in Coal Workers' Pneumoconiosis." Journal of Occupational and Environmental Medicine **44**(4): 372-377.

Zhang, Q., J. Dai, et al. (2002). "Roles of bioavailable iron and calcium in coal dust-induced oxidative stress: possible implications in coal workers' lung disease." Free Radical Research **36**(3): 285-94.



GRUPO DE INVESTIGACION
BIOMEDICA Y BIOLOGIA MOLECULAR



UNIVERSIDAD DEL SINU
Eliás Bechara Zainúm
Fundada en 1974



CONSENTIMIENTO INFORMADO
EVALUACIÓN DE LA EXPOSICIÓN, EFECTOS GENOTÓXICOS Y
SUSCEPTIBILIDAD GENÉTICA EN UNA POBLACIÓN OCUPACIONALMENTE
EXPUESTA A RESIDUOS DE MINERÍA DE CARBÓN

Yo _____, mayor de edad, he sido informado que el GRUPO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR de la Universidad del Sinú realizará el estudio “EVALUACIÓN DE LA EXPOSICIÓN, EFECTOS GENOTÓXICOS Y SUSCEPTIBILIDAD GENÉTICA EN UNA POBLACIÓN OCUPACIONALMENTE EXPUESTA A RESIDUOS DE MINERÍA DE CARBÓN” en trabajadores del yacimiento del Cerrejón - Departamento de la Guajira, y se me ha solicitado participar voluntariamente como sujeto de estudio.

OBJETIVO Y PROPÓSITO DEL ESTUDIO

Evaluar el daño genético en el ADN y efectos genotóxicos tempranos por exposición ocupacional a residuos de minería carbón y su asociación con los polimorfismos de los genes del metabolismo Citocromo P450 1A1 (CYP1A1) y de la Glutation S Transferasa M1 y T1 en trabajadores del yacimiento minero del Cerrejón, Guajira, con el propósito de encontrar herramientas fundamentales a ser usadas en programas de vigilancia epidemiológica, que conlleven además a implementar pruebas que faciliten la detección temprana de efectos precoces y la prevención de enfermedades ocasionadas por exposición ocupacional a agentes potencialmente genotóxicos, facilitando la toma de decisiones en lo referente al control y eliminación de riesgo en el ambiente laboral.

YO HE SIDO INFORMADO SOBRE LOS OBJETIVOS, PROPÓSITO, JUSTIFICACIÓN, METODOLOGÍA, RIESGOS Y BENEFICIOS DEL ESTUDIO. Conozco que el propósito de la investigación tiene relevancia social y científica y obedece a una problemática de salud ocupacional.

Conozco además, que en el mismo serán seleccionados 100 trabajadores expuestos a residuos de minería carbón y 100 trabajadores del yacimiento con trabajo de oficina sin antecedentes de exposición

tomado como grupo control, con el fin de contrastar en el análisis de los resultados qué individuos son más susceptibles a la exposición ocupacional de residuos de minería carbón.

Sobre la competencia, formación integral y calidad de los investigadores es responsable la **Universidad del Sinú**.

Los resultados del estudio son confidenciales y serán informados y explicados de forma confidencial al grupo objeto de estudio parte del investigador principal: **MILTON QUINTANASOSA**.

Los datos no serán utilizados con otra finalidad distinta al de esta investigación.

REQUERIMIENTOS. Yo, en pleno uso de mis facultades mentales, libre y consciente, estoy de acuerdo en participar en este estudio y entiendo que éste requiere de mi lo siguiente: contestar un cuestionario de aproximadamente 20 minutos, para suministrar información personal referente a mi edad, estado de salud, estilo de vida, historia ocupacional y familiar. Si soy seleccionado para el estudio deberé donar 30 mL de sangre tomada de la vena del brazo, de los cuales 20 ml serán procesados en el Laboratorio Investigación Biomédica y Biología Molecular de la Universidad del Sinú para la prueba *in vitro* de Mucronúcleos y la prueba del cometa. 10 mL serán utilizados por la Universidad del Cauca para el aislamiento de ADN e identificación de los polimorfismos genéticos. Una parte del ADN aislado será criopreservado en el Laboratorio de Toxicología Genética y Citogenética de la Universidad del Cauca.

RIESGOS DE PARTICIPACIÓN. Los riesgos potenciales de participación en el estudio son sangrado e infección en el sitio de la toma de la muestra de sangre, los cuales serán controlados por un profesional experto en la toma de muestras de sangre del brazo y el empleo de técnicas médicamente aceptadas y uso de jeringas y/o tubos y agujas estériles nuevas.

Para garantizar la confiabilidad de la información suministrada, los resultados de las pruebas serán codificados y se darán a conocer en forma grupal más no individual en un seminario, con el propósito de hacer una autorreflexión, luego de haber recibido una serie de conferencias.

Tengo claro que no se me proveerá ninguna compensación económica.

BENEFICIOS PARA EL PARTICIPANTE: Atender a dos cursos de capacitación sobre los diferentes riesgos a corto y largo plazo en la salud por la exposición ocupacional residuos de minería.

Reflexión y motivación hacia el cambio de actitud para la prevención de riesgos a la salud por exposición ocupacional a residuos de minería. Conocer los resultados grupales del estudio.

YO ENTIENDO QUE:

Mi participación es completamente voluntaria y que puedo rehusarme a responder cualquier pregunta si así lo deseo o puedo tomar libremente la decisión de finalizar mi participación en este monitoreo en cualquier momento, sin que ello represente perjuicios de índole legal con mi trabajo.

Esta investigación fue evaluada y aprobada por el comité ético de la Universidad del Sinú. La información recolectada será tratada de manera confidencial y mis respuestas serán reunidas con las de otros participantes para obtener resultados grupales.

La Universidad del Sinú y la Universidad del Cauca se compromete a vigilar que las muestras de sangre sean tomadas por un profesional experto y autorizado y en forma aséptica para evitar complicaciones.

Puedo preguntar cualquier interrogante o duda que tenga antes, durante o después del estudio, al investigador principal **MILTON QUINTANA SOSA** de la Universidad del Sinú responsable del estudio, en el Laboratorio de INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR ubicado en la Calle 38 Cra 1W - Barrio Juan XXIII de la ciudad de Montería, en los teléfonos 7841961 - 7840340 Ext. 143.

La firma del documento del consentimiento informado es requerida para todas las personas participantes en un estudio como éste.

Los procedimientos alternativos principales incluyendo procedimientos experimentales en este estudio, me han sido explicados en un lenguaje claro que yo he podido entender.

Los riesgos y molestias que pueden presentarse me han sido explicados claramente.

Acepto que el material genético (ADN) aislado de los linfocitos sea congelado y conservado en el laboratorio de Toxicología Genética y Citogenética de la Universidad del Cauca y empleado en futuras investigaciones para identificar polimorfismos en individuos que estén en mayor riesgo de desarrollar problemas de salud debido a ciertas características de su ADN y exposición ocupacional. El ADN no será usado para ningún tipo de discriminación laboral, racial, política, social o económica.

También entiendo que como mi nombre no será vinculado con los resultados del estudio, el investigador principal y sus coinvestigadores no estarán en la posibilidad de informar a ninguna otra persona sobre mis resultados con respecto a las pruebas realizadas.

Los resultados de este estudio podrán ser divulgados y/o publicados en revistas científicas en forma grupal sin que se dé a conocer mi nombre.

He leído este consentimiento, he entendido en qué consiste este estudio y también me fueron aclaradas las dudas al respecto, en consecuencia voluntariamente acepto participar como sujeto de estudio en el monitoreo biológico **“EVALUACIÓN DE LA EXPOSICIÓN, EFECTOS GENOTÓXICOS Y SUSCEPTIBILIDAD GENÉTICA EN UNA POBLACIÓN OCUPACIONALMENTE EXPUESTA A RESIDUOS DE MINERÍA DE CARBÓN”**.

Nombre del Participante

Firma del Participante

Nombre del Testigo

Firma del Testigo

MILTON QUINTANA SOSA

Director del proyecto



GRUPO DE INVESTIGACION
BIOMEDICA Y BIOLOGIA MOLECULAR



UNIVERSIDAD DEL SINU
Elías Bechara Zainúm
Fundada en 1974



CUESTIONARIO PERSONAL

CODIGO _____

1. Edad _____ en años:
2. Fecha de nacimiento _____ / _____ / _____
3. Dirección: _____
4. Teléfono fijo/celular _____
5. Grupo étnico: () Negro () Chino () Japonés () Indígena () Mestizo ()
6. Número de hijos: _____
7. Empleo anterior: _____
8. Función que ejercía: _____
9. ¿En su empleo anterior, estuvo expuesto a algunas de estas sustancias? (Informe el tiempo de exposición):
 () Derivados de petróleo _____ () Tintas/Colorantes _____ () Solventes _____
 () Otros residuos de minería _____ () Mercurio/Vapores _____ () Polvo de carbón _____
- Otras sustancias químicas
¿Cuáles? _____
10. Función actual en la cadena de producción: _____
11. Tiempo de servicio: _____
12. ¿En su empleo actual, ya se expuso a alguna de estas sustancias? (Informe el tiempo de exposición):
 () Derivados de petróleo _____ () Emisiones Diesel _____ () Solventes _____
 () Residuos de minería de carbón _____ () Mercurio/Otros metales pesados _____
- Otras sustancias químicas ¿Cuáles? _____
13. Utiliza equipos de seguridad: () Si () No

14. ¿Usted come inmediatamente después de trabajar? Si No
15. ¿Espera para hacerlo? Si No
16. Si su respuesta es afirmativa, ¿se lava las manos antes de ingerir algún alimento?
 Si No
17. ¿Fuma? Si No – Si su respuesta es NO, pase a la pregunta 22.
18. ¿Cuántos años lleva fumando?_____
19. ¿Todavía fuma? Si No – Si su respuesta es NO, ¿hace cuántos años lo dejó?_____
20. Si su respuesta es afirmativa, ¿Cuántos cigarrillos al día fuma? Menos de medio paquete De medio a un paquete Uno a dos paquetes Más de dos paquetes
21. Fuma también: Pipa Tabaco - ¿Cuántas veces al día?_____
22. Medicamentos utilizados rutinariamente / Indicar la frecuencia:
 Vitaminas y suplementos _____ Píldoras para presión _____ Antibióticos _____
 Insulina; Tranquilizantes _____ Relajantes musculares _____ Otros _____
23. Está bajo algún tipo de tratamiento Si No ¿Cuál?_____
24. ¿Consume bebidas alcohólicas? Si No ¿Cuál?_____
- Frecuencia: _____
25. ¿Ingiera frutas y verduras? Si No ¿Cuáles? _____
- Frecuencia: _____
26. ¿Ingiera carnes blancas? Si No ¿Cuál? _____
- Frecuencia: _____
27. Prefiere las carnes: crudas medio cocidas bien cocidas gordas magras.
28. Enfermedades padecidas: cáncer VIH – SIDA anemia dolencias cardíacas diabetes
Otras _____
29. ¿Tiene conocimiento de algún defecto de nacimiento o dolencia hereditaria que afecten a sus padres, hermanos o cónyuge?
Si _____ No _____ ¿Cuál? _____ (es)
30. ¿Usted y su cónyuge han tenido dificultades para concebir? Si No

31. ¿Han sido diagnosticados como estériles? () Si () No

32. ¿Historia de aborto espontáneo? () Si () No

33. ¿Historia de bebés con defectos? () Si () No

34. ¿Posee hermano gemelo idéntico? () Si () No

35. Caso de cáncer en la familia: () Si () No – Grado de parentesco:

36. Tipos de cáncer: () Piel () Mama () Leucemia () Esófago
Otros _____