



INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
COMISSÃO DE GRADUAÇÃO

Biomonitoramento em trabalhadores do setor coureiro-calçadista do Rio
Grande do Sul.

Camile Ancines

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Kátia Kvitko

Co-orientadora: Ms Paula Rohr

Porto Alegre, novembro de 2011

SUMÁRIO

RESUMO.....	4
ABSTRACT.....	6
INTRODUÇÃO	7
1. Exposição ocupacional.....	7
2. Setor coureiro-calçadista no Rio Grande do Sul	8
2.1. Produção de Couro	8
2.2. Produção de Calçados	8
3. Biomonitoramento.....	9
3.1. Biomarcadores	9
3.1.1. Biomarcadores de Exposição.....	9
3.1.2. Biomarcadores de Efeito.....	10
3.1.3. Biomarcadores de Suscetibilidade.....	11
4. Sistema de reparo em humanos.....	11
4.1. Via BER	12
4.2. Via NER	14
4.3. Reparo de quebra na dupla fita.....	15
OBJETIVOS.....	19
METODOLOGIA	20
1. Amostra	20
2. Genotipagem por PCR/RFLP	21
3. Teste de Micronúcleo	26
4. Ensaio Cometa.....	27

5. Análise estatística	28
RESULTADOS	29
1. Polimorfismos da via BER.....	33
2. Polimorfismos da via NER.....	33
3. Polimorfismos da via HR	33
4. Polimorfismos da via NHEJ.....	33
DISCUSSÃO	35
REFERÊNCIAS.....	38
ANEXO 1.....	45

RESUMO

A indústria calçadista desempenha um importante papel na economia brasileira, gerando cerca de 300 mil empregos diretos. O Rio Grande do Sul é responsável por 37% do total de pessoas ocupadas assalariadas na fabricação de calçados, sendo a região do Vale do Rio dos Sinos (RS) o maior pólo produtor de calçados do Brasil, concentrando 40% da produção de calçados. Os sistemas de metabolização e reparo de DNA são importantes moduladores dos efeitos da exposição a substâncias genotóxicas. O presente estudo teve como objetivo principal avaliar a influência dos polimorfismos em genes de reparo: *OGG1*Ser326Cys*, *XRCC1*Arg194Trp*, *XPD*Ile199Met*, *XPD*Asp312Asn*, *Rad51*G135C* e *XRCC4*Ile401Thr*, nos níveis de danos ao DNA em trabalhadores do setor coureiro-calçadista. A genotipagem destes polimorfismos foi realizada utilizando a técnica de PCR/RFLP. Os danos no DNA foram avaliados pelas técnicas de Ensaio Cometa (Índice de Danos – ID e Frequência de Danos - FD) e Teste de Micronúcleo (MN) em 93 indivíduos (10 mulheres e 83 homens), sendo 29 trabalhadores de fábrica de sapatos (TFS) e 29 trabalhadores de curtumes (TC), ambos da região do Vale do Rio dos Sinos (RS). As análises estatísticas de índice de dano (ID), frequência de dano (FD) e micronúcleo (MN) entre os diferentes genótipos foram realizadas com o teste não paramétrico de Mann-Whitney. No grupo exposto dos TC, indivíduos com presença do alelo polimórfico *XRCC1*194Trp* apresentaram aumento significativo em ID e FD em relação aos indivíduos do mesmo grupo com o genótipo selvagem ($P=0,033$ e $P=0,047$, respectivamente). O mesmo foi observado com a presença do genótipo *Rad51 C/* – em relação ao genótipo *Rad51 G/G* ($P=0,017$ para ID e $P=0,036$ para FD). No grupo não-exposto, foi observada uma diferença significativa no ID ($P=0,041$), sendo que indivíduos com o genótipo *XPD Gln/* – apresentaram melhores resultados para este biomarcador. No grupo exposto dos TFS, os indivíduos com genótipo de *XRCC4* selvagem (*Ile/Ile*) tiveram frequências de MN em mucosa oral significativamente menores em relação aos indivíduos com a presença do alelo mutante (*Thr/* –), com $P=0,035$. Os resultados demonstram que os danos detectados pelo Ensaio Cometa, principalmente danos oxidativos, quebras de fita simples e dupla, *crosslinks* DNA-DNA e DNA–proteína, causados pela exposição a substâncias encontradas nos curtumes, são reparados

preferencialmente pela via de reparo por excisão de base (BER), que é responsável pela reparação de pequenas lesões como bases oxidadas ou reduzidas, e pela via de reparo por recombinação homóloga (HR), que atua no reparo de quebras de fita dupla. Enquanto que no reparo dos danos detectados no Teste de MN, clastogênese e aneugênese, provocados pela exposição ao ambiente de trabalho de fábricas de calçados, é a via de reparo por recombinação não homóloga (NHEJ), que também atua no reparo de quebras de fita dupla.

ABSTRACT

The footwear industry has an important role in the Brazilian economy, and employ directly about 300 thousand workers. The Rio Grande do Sul state accounts for 37% of total employed persons in the manufacture of footwear, and the Sinos River Valley (RS) is the largest footwear producers in Brazil, concentrating 40% of footwear production. The metabolizing and DNA repair are important modulators of effects exposure to genotoxic substances. The aim of present study was evaluated the influence of repair genes polymorphisms *OGG1*Ser326Cys*, *XRCC1*Arg194Trp*, *XPB*Ile199Met*, *XPB*Asp312Asn*, *Rad51*G135C* e *XRCC4*Ile401Thr* in the DNA damage of footwear workers. The genotyping was performed using PCR/RFLP. The DNA damage was detected by Comet Assay (Damage Index – DI and Damage Frequency – DF) and Micronucleus Test (MN) in 93 subjects (10 women and 83 men), of these 29 footwear workers (FWW) and 29 tannery workers (TW), both from Sinos River Valley. Statistical analysis of DI, DF and MN between the different genotypes were performed using the nonparametric Mann-Whitney test. The TW group, individuals with *XRCC1*194Trp* allele presents a statistical increase in DI and DF in relation to individuals of the same group with wild genotype ($P=0.033$ e $P=0.047$, respectively). The same was observed with the presence of *Rad51 C/–* genotype in relation of *Rad51 G/G* wild genotype ($P=0.017$ to DI and $P=0.036$ to DF). In non-exposed group, was observed a statistical difference in DI ($P=0.041$), so that individuals with *XPB Gln/–* presents better results to this biomarker. In FWW group, individuals with the *XRCC4* wild genotype (*Ile/Ile*) presents significantly lower frequencies of MN in mucosa oral cells in relation to individuals with mutant allele (*Thr/–*), with $P=0.035$. The results show that DNA damage detected by Comet Assay, mainly oxidative damage, DNA strand breaks, DNA-DNA and DNA-protein crosslinks, due to exposure to substances of tannery are rather repaired by BER pathway, that is responsible to repair of small lesions such as oxidized and reduced bases, and by HR pathway, which acts in DNA breaks repair. While the repair of damage detected by MN Test, clastogenesis and aneuploidy, caused by exposure to the work environment of shoe factories, is the NHEJ pathway, which acts in the repair of double strand breaks.

INTRODUÇÃO:

1. Exposição Ocupacional:

O desenvolvimento industrial trouxe ao ser humano a exposição ocupacional a um número crescente de substâncias químicas – sintéticas ou naturais – que podem causar sérios efeitos toxicológicos. Como ainda não se sabem quais são os riscos causados ao nosso organismo e ao meio ambiente pela utilização de grande parte destas substâncias estudos que explanam as consequências da exposição, possíveis prejuízos e capacidade do organismo de reparar os danos são de suma importância. (Lucas *et. al.*, 2001),

Estas substâncias podem provocar um efeito mutagênico e carcinogênico em populações expostas acidentalmente ou por estilo de vida, mas são aquelas expostas ocupacionalmente, onde trabalhadores as manipulam rotineiramente, que constituem o maior grupo de risco devido ao contato contínuo (Maluf & Erdtmann, 2003).

A exposição a agentes genotóxicos pode causar sérios danos às células e, principalmente, ao DNA. Estes danos em células germinativas podem acarretar sérios problemas reprodutivos, inclusive infertilidade. Estudos de risco ocupacional mostram aumento nas taxas de aborto espontâneo em mulheres que trabalham com produtos químicos em hospitais e laboratórios (Keshava & ONG, 1999).

Há evidências que mostram que fatores ambientais podem ser os maiores responsáveis pelo desenvolvimento do câncer e que o ambiente de trabalho é o principal local onde ocorre a exposição a agentes potencialmente carcinogênicos (Keshava & ONG, 1999). E segundo o National Occupation Research Agenda Team, a exposição ocupacional é a responsável por aproximadamente 4% dos casos de câncer em humanos (NORA, 2003).

2. Setor Coureiro-calçadista no Rio Grande do Sul:

A indústria calçadista desempenha um importante papel na economia brasileira, gerando cerca de 300 mil empregos diretos, sendo o Rio Grande do Sul responsável por 37% do total de pessoas ocupadas assalariadas na fabricação de calçados (ABICALÇADOS, 2009). A região do Vale do Rio dos Sinos (RS) é o maior pólo produtor de calçados do Brasil e está entre os maiores do mundo, tendo aproximadamente 2.700 fábricas em atividade

(ABICALÇADOS, 2009) e concentrando 40% da produção de calçados (Gorini & Siqueira, 1999; Corrêa, 2001).

A indústria Brasileira de couro possui cerca de 700 curtumes, o que gera cerca de 65 mil empregos formais diretos. As regiões de maior destaque são as regiões Sul e Sudeste, sendo que a região Sul possui 42% do total de estabelecimentos curtidores nacionais (Corrêa, 2001).

2.1. Produção de Couro:

No setor de produção de couro, os trabalhadores também entram em contato com diversas substâncias químicas, sendo o modo de exposição variável (Stern, 2003). Em relação ao risco ocupacional a produtos potencialmente genotóxicos, destacam-se os setores de curtimento e recurtimento pelo uso de ácidos e sais de cromo, e da fase de acabamento, pela utilização de uma ampla gama de substâncias, como anilinas, tintas, lacas, solventes, fixadores e fragmentos de couro com resquícios de cromo (Sbrana *et al.*, 1991; Stupar *et al.*, 1999).

2.2. Produção de Calçados:

A mão-de-obra do setor calçadista também está constantemente exposta a solventes orgânicos encontrados em colas, adesivos, entre outros, destacando-se substâncias como tolueno, n-hexano, acetona e metiletilcetona (Pitarque *et al.*, 1999; Uuksulainen *et al.*, 2002; Heuser *et al.*, 2007). Não se sabe que efeitos essas substâncias podem acarretar à saúde quando misturadas com outras substâncias orgânicas. Ainda existe a associação entre o aumento de casos de câncer e a exposição de trabalhadores em fábricas de calçados, sendo este fato atribuído à mistura de solventes, como o benzeno, a poeira do couro e algumas substâncias encontradas em colas e adesivos (Mayan *et al.*, 1999; Constantini *et al.*, 1990; Bulbulyan *et al.*, 1998; Zaridze *et al.*, 2001). O benzeno, substância encontrada em solventes, é descrito como tendo ação carcinógena e hemotóxica e de causar danos cromossômicos em trabalhadores expostos cronicamente a ele (EPA, 2002).

3. Biomonitoramento:

O biomonitoramento prevê uma aplicação epidemiológica utilizada para mensurar a distribuição de elementos tóxicos na população, e também relacionar esses indicadores biológicos com modificações na saúde dos indivíduos expostos (Pivetta *et al.*, 2001; Amorim, 2003; Siemiatycki *et al.*, 2004).

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

3.1. Biomarcadores

3.1.1. Biomarcadores de exposição:

Os biomarcadores de exposição são ferramentas importantes para medir a quantidade de substâncias químicas e/ou metabólitos em fluidos biológicos e medir uma alteração bioquímica precoce e reversível no organismo, podendo assim, indicar se houve ou não exposição e qual foi o seu grau. O primeiro indicador biológico de exposição estima a dose interna pela determinação da substância e/ou seu produto de biotransformação. Alguns biomarcadores de dose interna, como benzeno no sangue, ácido hipúrico e 2,5-hexanodiona na urina, refletem apenas a exposição recente ao benzeno, tolueno e n-hexano, respectivamente, enquanto outros refletem a exposição média dos últimos meses, como o chumbo e mercúrio no sangue, ou até mesmo em anos, como cádmio na urina (Lowry, 1995; World Health Organization, 2001; Bonassi & Au, 2002; Amorim, 2003).

Outros tipos de biomarcadores de exposição mostram uma medida de quebras de DNA reparáveis. O Ensaio Cometa ou eletroforese em gel de núcleo individual (Figura 1) é utilizado para a detecção de efeitos de exposição à mutágenos e carcinógenos, que quando avaliado logo após a exposição mostra a ação do xenobiótico refletida em quebras simples e dupla no DNA,

dano oxidativo, *crosslinks*, indução de apoptose entre outros (Somorovská *et al.*, 1999).

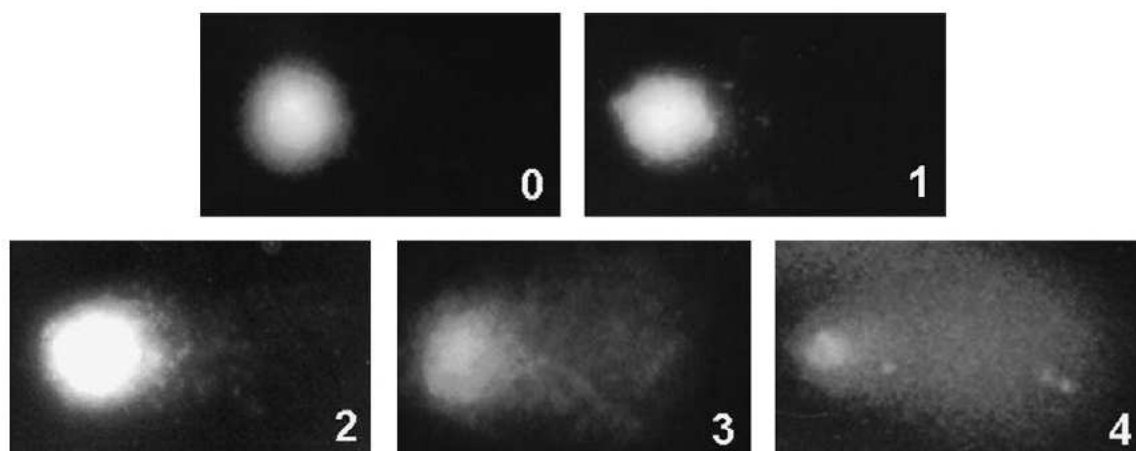


Figura 1. Teste Cometa, células classificadas de 0, sem dano a 4, com a maior parte do DNA na “cauda do cometa”. Imagem modificada de Heuser *et al.* (2007).

3.1.2. Biomarcadores de efeito:

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

O teste do MN (Figura 2) é um dos mais utilizados como padrão de aberrações cromossômicas em eucariotos, sendo o mais eficaz para o monitoramento humano. A formação do micronúcleo é resultado da perda de cromossomos inteiros, ou apenas fragmentos de cromossomos. Assim, este teste detecta: mutagênese cromossômica, como clastogênese e aneugênese (Villela *et al.*, 2003; Maluf & Erdtmann, 2003). Em uma análise conjunta, na mesma amostra, de Teste Cometa e Teste MN, pode-se inferir a atividade de mecanismos de reparo.

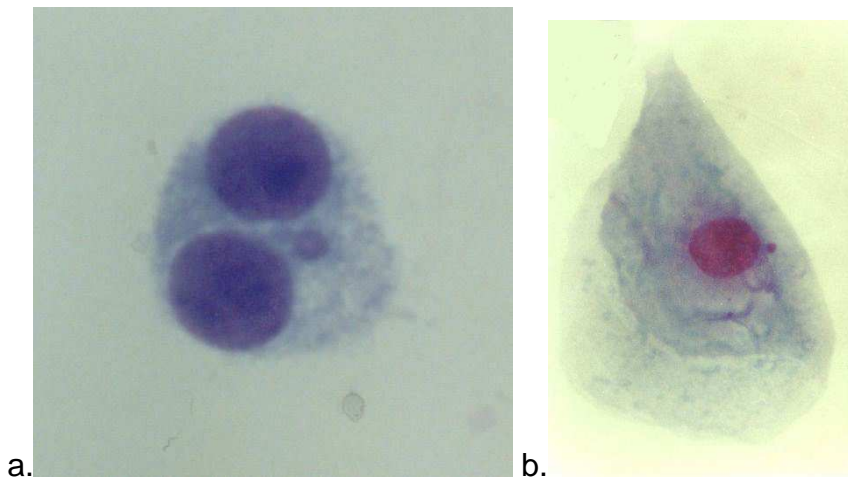


Figura 2. Teste de Micronúcleo: a. Linfócito Binucleado com micronúcleo. b. Célula da mucosa oral com micronúcleo. Imagens cedidas por Vanina Heuser.

3.1.3. Biomarcadores de suscetibilidade:

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

4. Sistema de reparo em humanos

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

O sistema de reparo é dividido em vias, conforme o tipo de lesão em que ocorre, e em cada uma delas um grupo diferentes de enzimas é responsável pelo processo de reparo. Em humanos, foram descritas as seguintes vias: reversão do dano *in situ*, reparo por excisão de base (BER), reparo por excisão de nucleotídeo (NER), reparo de emparelhamento incorreto de bases (*mismatch repair* ou MMR), reparo em quebra na dupla fita (Recombinação Homóloga e Recombinação Não-Homóloga) (Goode *et al.*, 2002; Saffi & Henriques, 2003; Costa & Menck, 2004). Nosso grupo de pesquisa vem desenvolvendo trabalhos relacionando os efeitos destes polimorfismos em diferentes setores de atuação. No presente trabalho, será focado genes da via BER, da via NER, da via por Recombinação Homóloga e da via por Recombinação Não-Homóloga.

4.1. Via BER

A via BER atua em pequenas lesões como bases oxidadas ou reduzidas, aductos fragmentados ou produzidos por agentes alquilantes. Nesta via (Figura 3), a base com dano é removida por uma DNA glicosilase específica para cada uma das bases nitrogenadas, formando um sítio apurínico-apirimidínico ou abásico, sítio AP. Uma enzima AP endonuclease (por exemplo, a AP liase, hAP e AP hidrolase) cliva a ligação fosfodiéster da cadeia de DNA, a DNA Polimerase I remove a unidade residual de desoxirribose e insere a base correta. Após, a DNA ligase restaura a fita, pela via curta de BER. Enquanto que na via longa de BER são removidos de 2 a 13 nucleotídeos (Goode *et al.*, 2002; Saffi & Henriques, 2003). Porém, a maioria das DNA glicosilases envolvidas na via BER possuem também a atividade AP liases e, por isso, são conhecidas como DNA glicosilases bifuncionais, como as proteínas Ogg1 e Ntg1. Após a ação de uma DNA glicosilase bifuncional, os sítios AP seguem sendo processados pelas demais enzimas envolvidas na via. Além das enzimas envolvidas em cada passo, existe também a proteína Xrcc1 que não atua diretamente na lesão do DNA, mas tem papel importante na coordenação da interação das várias enzimas envolvidas nesta via, como a Ogg1 (Marsin *et al.*, 2003).

Alguns genes do sistema BER apresentam-se polimórficos e estudos associam estas variações com a suscetibilidade para a incorporação de danos

no DNA e desenvolvimento de doenças como câncer (Lunn *et al.*, 1999; Hao *et al.*, 2004). Como exemplo, o polimorfismo no códon 326 do gene *OGG1*, resulta em uma troca do aminoácido serina por uma cisteína. Esta variante (*OGG1* 326Cys) gera uma proteína com menor atividade enzimática atuando no reparo causado por lesões derivadas de estresse oxidativo. Estudos deste polimorfismo sugerem o como um fator de risco de uma variedade de tumores humanos (Kohno *et al.*, 1998; Ito *et al.*, 2002; Takezaki, *et al.*, 2002; Hansen *et al.*, 2005).

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

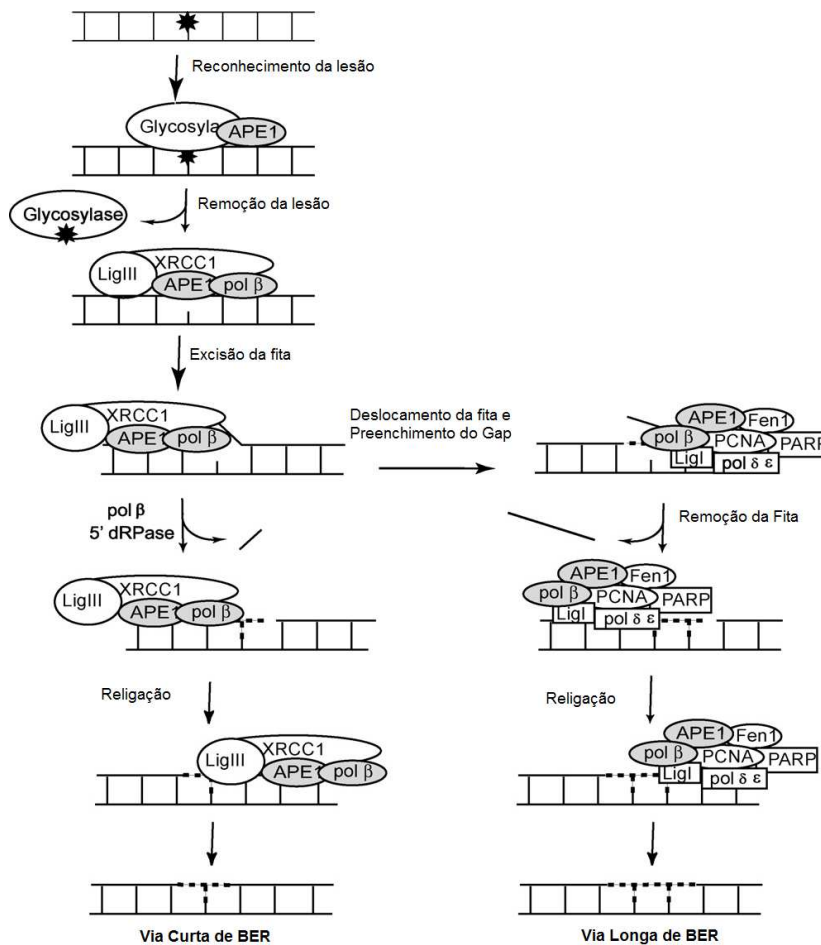


Figura 3. Reparo por Excisão de base em humanos. A via curta inicia com a atividade glicosilase seguida pela excisão e remoção da base com dano pela APE1 e posterior incorporação de bases corretas pela DNA Polimerase I e ligação para a reparação da fita. A via longa é semelhante, mas após a excisão da fita há a remoção de um número maior de nucleotídeos.

4.2. Via NER:

A via NER repara lesões maiores, que levam a distorções estruturais importantes na cadeia de DNA, como: dímeros de pirimidinas, grandes aductos químicos e cross-link. A via NER (Figura 4) é subdividida em duas vias: Reparo Acoplado à Transcrição (TCR) e Reparo Geral do Genoma (GGR) (van Hoffen *et al.*, 2003).

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

A via de GGR que envolve a atividade de reparo nas lesões de DNA pelo genoma inicia-se pelo reconhecimento do dano através do complexo enzimático Xpc/hHR23B, que fará o recrutamento das demais proteínas envolvidas na reparação global do genoma. Primeiramente são recrutadas as proteínas Xpb e Xpd (helicases) e os componentes do fator de transcrição da RNA polimerase II (TFIIH), estes fazem a abertura de cerca de 30 pares de base em torno da lesão. A proteína Xpa é a responsável pelo correto posicionamento e estabilização do complexo enzimático e reconhece estruturas anormais no DNA e juntamente com a proteína Rpa, liga-se a regiões de cadeia simples de DNA. Este complexo possibilita a remoção desta região através de moléculas como Ercc1-Xpf e Xpg. Após a incisão ocorre a síntese correta desta região removida pela DNA polimerase (Goode *et al.*, 2002; Saffi & Henriques, 2003; Costa & Menck, 2004).

Estudos demonstram que polimorfismos nos genes da via NER estão relacionados com diferenças na capacidade de reparo individual. Como exemplo os polimorfismos no gene *XPD*, que ocorrem nos códons 199 (Ile/Met), 312(Asp/Asn) e 715 (Lys/Gln) (Lunn *et al.*, 2000). Diferentes trabalhos

demonstraram relação entre aumento da frequência de aberrações cromossômicas induzidas por xenobióticos e o polimorfismo no códon 312 do gene *XPD* (Lunn *et al.*, 2000; Au *et al.*, 2003; Gao *et al.*, 2003).

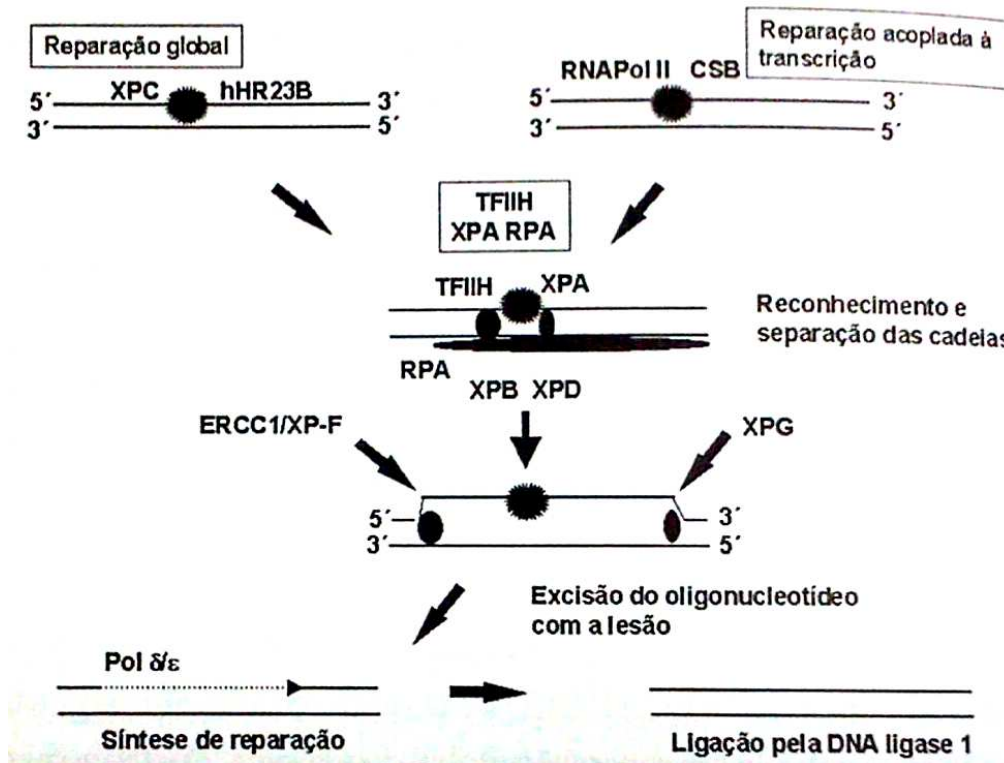


Figura 4. Esquema da via NER. As diferentes maneiras de reconhecimentos de danos para GGR e para TCR são seguidos por um processamento de lesão que para as duas vias requerem as mesmas enzimas. Modificado de van Hoffen *et al.* (2003)

4.3. Reparo de quebra na dupla fita:

A quebra da dupla fita de DNA pode ser ocasionada tanto por erro durante a replicação, como pela ação de agentes exógenos como radiações ionizantes. Existem duas vias para este mecanismo de reparo: recombinação homóloga e recombinação não homóloga.

O reparo por Recombinação Homóloga (HR) (Figura 5) atua nas quebras duplas presentes logo após a duplicação do DNA e necessita de uma segunda cópia intacta, a qual é invadida pela fita danificada e servirá como molde. Neste processo estão envolvidas mais de 16 proteínas, como BRCA1, BRCA2, conhecidos por estarem envolvidos no desenvolvimento do câncer de mama. Inicialmente o complexo Rad50/Mre11/Nbs1 com a sua atividade

exonucleotídica 5'–3' excisa alguns nucleotídeos. As extremidades 3' livres são envoltas por Rad52 para protegê-las contra digestão por endonucleases celulares, além de facilitar o posicionamento de Rad51. Com a proteína Rad51, que tem a habilidade de trocar a fita simples com a mesma seqüência de uma molécula de DNA de fita dupla, e outras proteínas como Rad54, Xrcc2, Xrcc3, as cadeias danificadas formam heteroduplex com cadeias intactas de uma cromátide irmã ou de um cromossomo homólogo e ocorre a síntese por uma DNA polimerase. Então, as cadeias se separam com a resolução das junções de Holliday e as terminações das cadeias reparadas são ligadas pela DNA ligase (Goode *et al.*, 2002; Costa & Menck, 2004). Polimorfismos no gene *RAD51* levam a diferenças na suscetibilidade para o desenvolvimento de leucemia mielóide aguda em resposta a terapia, de câncer de mama e de câncer gástrico (Wang *et al.*, 2001; Jawad *et al.*, 2006; Poplawski, *et al.*, 2006).

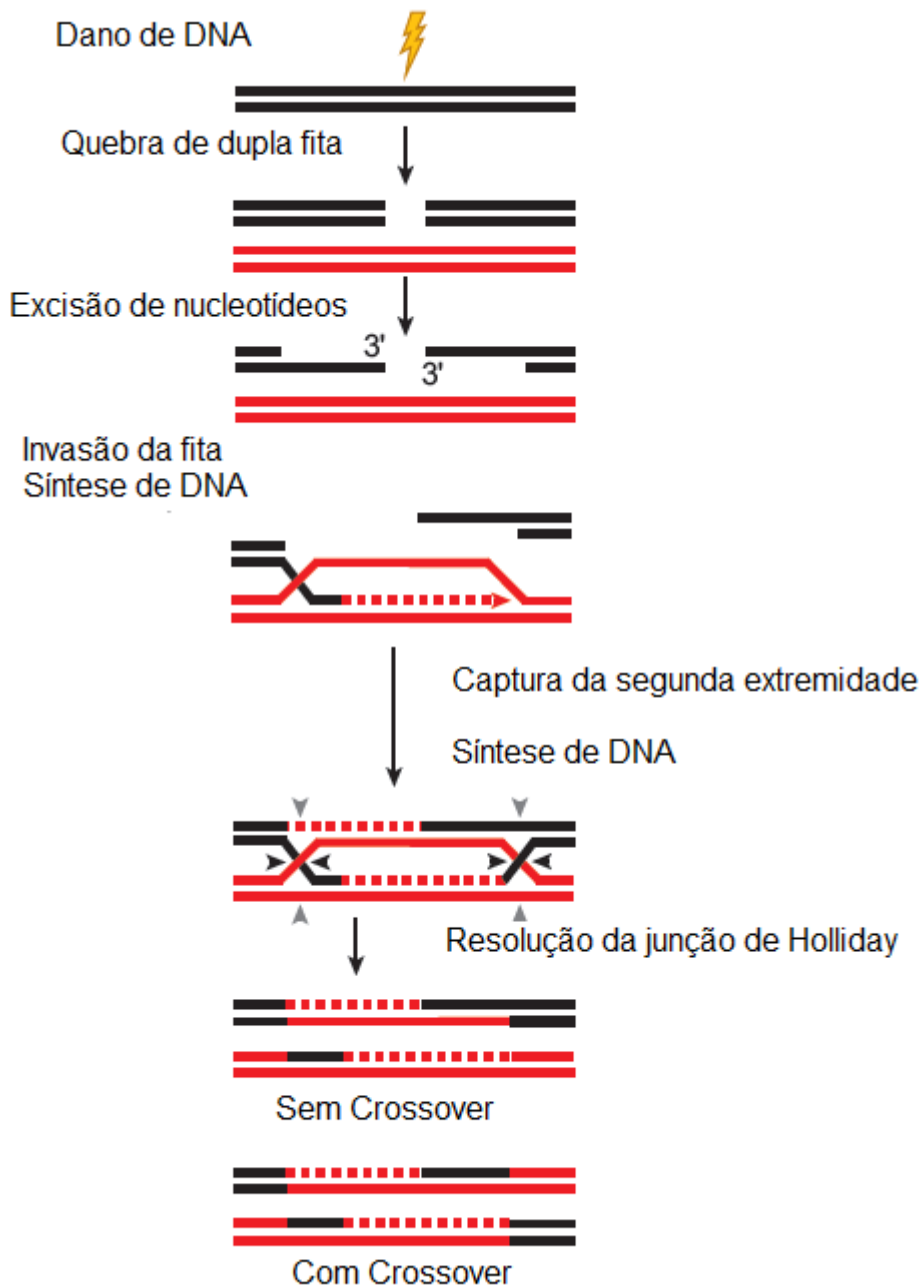


Figura 5. Esquema da via de Recombinação Homóloga. Com o reconhecimento de quebra de fita dupla há um pareamento entre a fita danificada e sua homóloga que serve de molde para a síntese de DNA. Modificado de San Felippo *et al.* (2008).

Já a recombinação não homóloga (NHEJ) (Figura 6) faz simplesmente a ligação de duas extremidades de dupla fita quebradas que forem encontradas em uma célula, sem o emprego de moldes. As principais proteínas envolvidas neste mecanismo de reparo são KU e DNA-PK_{CS}. A proteína KU reconhece as extremidades livres, ligando-se a elas, para facilitar o acesso de DNA-PK_{CS} à

região. Após o recrutamento de Xrcc4 e da DNA ligase IV que efetuarão a junção das extremidades (Goode *et al.*, 2002; Costa & Menck, 2004).

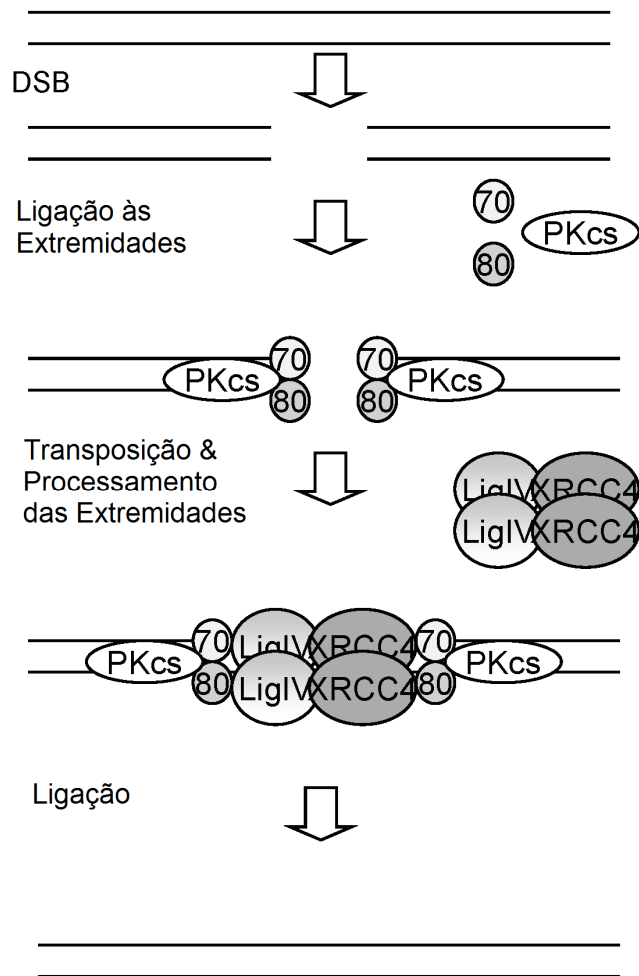


Figura 6. Esquema da via de Recombinação Não Homóloga em células de mamíferos. Após o reconhecimento das extremidades, estas são processadas e, em seguida, religadas. Modificado de Pastwa & Blasiak (2003).

OBJETIVOS:

Para este trabalho, foram realizadas as seguintes atividades:

- Organização dos dados de biomarcadores de suscetibilidade – genes de reparo XRCC1, OGG1 e XPD – e resultados de análise de biomarcadores de exposição e efeito – Ensaio Cometa e Teste de Micronúcleo – já feitos em trabalhos anteriores;
- Foram adicionadas novas análises de polimorfismos de genes de reparo – XRCC4 e RAD51;
- Os resultados dos biomarcadores de suscetibilidade foram associados com os dados dos biomarcadores de exposição e de efeito e foi discutida a influencia dos polimorfismos nestes.

METODOLOGIA:

1. Amostra

As amostras utilizadas neste trabalho fazem parte de um banco de DNA não identificado que se encontra no Laboratório de Imunogenética – Departamento de Genética da UFRGS sob responsabilidade da Dr^a. Kátia Kvitko.

As amostras foram coletadas em fábricas de calçado e curtumes da Região do Vale do Rio dos Sinos. Os participantes assinaram um termo de consentimento e responderam à entrevista sobre saúde ocupacional (Anexo1) – versão em português do questionário da *International Commission for Protection against Environmental Mutagens and Carcinogens*; (Carrano & Natarajan, 1988).

As coletas de sangue periférico foram feitas com a utilização de *vacutainers* com heparina e EDTA, processadas o mais rápido possível para evitar problemas com a estocagem, e a extração de DNA foi feita conforme descrito na literatura (Miller *et al.*, 1995).

Neste estudo foram envolvidos ao todo 93 indivíduos (10 mulheres e 83 homens), sendo 29 trabalhadores de fábrica de sapatos (TFS) e 29 trabalhadores de curtumes (TC), ambos da região do Vale do Rio dos Sinos (RS) (Figura 7). Para o grupo de não expostos foram utilizados um total de 35 indivíduos, sendo que para o grupo TFS foi utilizado 34 indivíduos controle e para o grupo TC foram utilizados 25 controles (alguns controles foram utilizados para ambos os grupos) os quais o material foi coletado no mesmo período do grupo exposto. O tempo médio de exposição do grupo TFS foi de $4,78 \pm 6,18$ anos e para o grupo TC foi de $10,92 \pm 7,62$ anos, a média de idade para os dois grupos é de $28,3 \pm 7,5$.

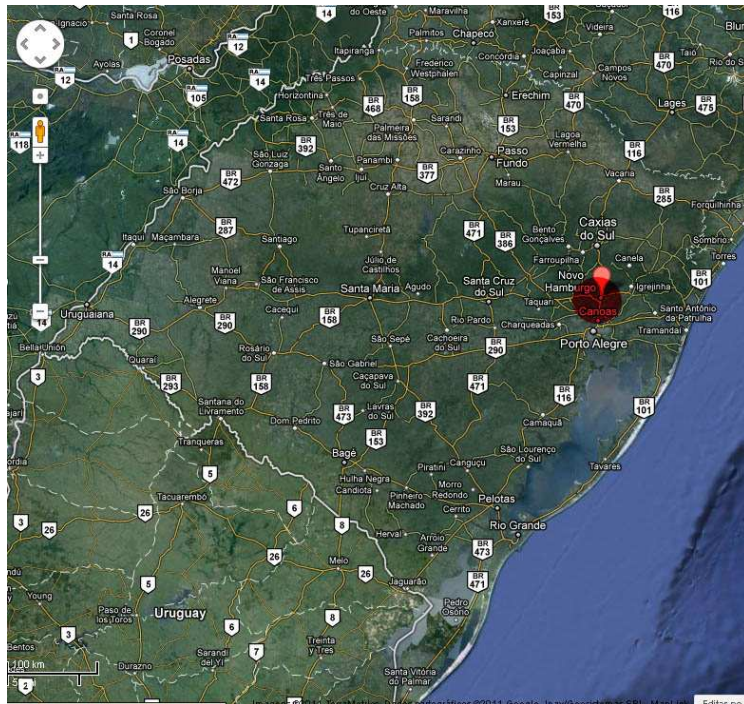


Figura 7. Mapa do RS mostrando a região do Vale do Rio dos Sinos (círculo vermelho).

2. Genotipagem

Os polimorfismos foram analisados pela técnica de PCR/RFLP. Os *primers* e as enzimas de restrição foram utilizados conforme descritos na literatura (Tabela 1). As reações e as condições de amplificação foram padronizadas no Laboratório de Imunogenética da UFRGS.

XRCC4 Ile 401Thr

A reação de amplificação do fragmento de 277pb foi realizada no volume total de 25µl, sendo utilizados:

100ng de DNA genômico

10pmol de cada *primer*

Tampão 1X (Invitrogen)

1,5mM de MgCl₂ (Invitrogen)

0,8µM de cada dNTP

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

O programa de temperatura usado para a amplificação do fragmento de 277pb foi: 94°C por 5 minutos, 30ciclos de 94°C por 30 segundos, 30 segundos

a 52°C, 30 segundos a 72°C, e extensão final de 72°C por 5 minutos. Para a determinação do genótipo, o fragmento foi digerido com a enzima de restrição *BstNI*, a 60°C, por 8hs.

RAD51 G135C

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

- 100ng de DNA genômico
- 10pmol de cada *primer*
- Tampão 1X (Invitrogen)
- 1,5mM de MgCl₂ (Invitrogen)
- 0,8µM de cada dNTP
- 1,0U *Taq* DNA polymerase (Invitrogen).

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

XPD Lys751Gln

A reação para a amplificação do fragmento de 436pb do gene *XPD*, foi feita num volume total de 25µl e constou de:

- 100ng de DNA genômico
- 10pmol de cada *primer*
- Tampão 1X (Invitrogen)
- 1,5mM de MgCl₂ (Invitrogen)
- 2,5mM de cada dNTP
- 1,0U *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen).

As condições de temperatura foram: 94°C por 3 minutos para desnaturação inicial, 38 ciclos de 45 segundos a 94°C, 60 °C por 45 segundos, 72 °C por 60 segundos, seguidos de 7 minutos a 72 °C, para a extensão final. Após a amplificação, os fragmentos de 436pb foram clivados com 1U da enzima de restrição *PstI* por 8hs a 37°C, sendo a visualização dos genótipos

realizada em gel de agarose 3%, corado com brometo de etídeo (Marin *et al.* 2004).

OGG1*Ser326Cys

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

- 100ng de DNA genômico
- 10pmol de cada *primer*
- Tampão 1X (Invitrogen)
- 1,5mM de MgCl₂ (Invitrogen)
- 1µM de cada dNTP
- 1,0U *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen).

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

XRCC1*Arg194Trp

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

- 100ng de DNA genômico
- 10pmol de cada *primer*
- Tampão 1X (Invitrogen)
- 1,5mM de MgCl₂ (Invitrogen)
- 1µM de cada dNTP
- 1,0U *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen).

O programa de temperatura utilizado foi: 2 minutos de desnaturação inicial a 95°C, 12 ciclos em *touchdown* de 20 segundos a 95°C, 15 segundos a 67°C (decrecendo em uma taxa de 1°C por ciclo) e 1 minuto a 72°C, seguidos de 24 ciclos de 95°C por 40 segundos, 40 segundos a 55°C, 30 segundos a

72°C e mais 10 minutos de extensão final a 72°C. Os fragmentos amplificados foram clivados com 1U da enzima de restrição PvuII a 37°C, por 8hs. A análise dos genótipos foi feita em gel de agarose 3% corado com brometo de etídeo.

Tabela 1. Vias, genes, polimorfismos que foram estudados, com *primers* utilizados.

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

3. Teste de Micronúcleo

Para cada amostra de sangue, foram feitas duplicatas de cultura de linfócitos adicionando 0,3ml de sangue total em 5mL de meio RPMI 1640 (Nutricell, Campinas – SP, Brasil), que continha 1% (v/v) de fitoemaglutinina. Os frascos foram incubados a 37°C por 44 horas antes da adição de citocalasina B (Sigma), seguindo a incubação até o tempo de incubação totalizar 72 horas, como descrito por Fenech *et al.* (1999). Após a incubação, linfócitos passaram por centrifugação a 800rpm por 8min, fixados em 3:1 (v/v) metanol/ ácidos acético, colocados em lâmina de microscópio limpa, e corados com 5% (v/v) de Giemsa. De cada amostra, 2000 células (1000 de cada lâmina, sendo duas por cultura) foram contadas para a presença de MN, utilizou-se microscópio ótico com aumento de 200-1000x. Todas as lâminas foram codificadas para uma análise cega.

Células da mucosa oral foram coletadas usando um swab na parte inferior das bochechas dos indivíduos e um palito de madeira foi usado para comprimir a língua. Cada swab foi imerso em 5 ml de solução salina (0,9% NaCl aquoso) em um falcon e transportado em um compartimento refrigerado até o laboratório onde a solução salina foi centrifugada a 1500 rpm por 8 minutos, e a camada de células bucais lavadas mais duas vezes com a solução salina sob as mesmas condições de centrifugação para remover bactérias e células debridadas que podem comprometer a contagem. Depois da lavagem, uma gota da suspensão de células foi colocada em cada lâmina de microscópio duplicada e postas para secar em temperatura ambiente por 1 – 2 semanas então coradas (hidrolisadas em 1N de HCl a 60°C por 10 minutos seguido de imersão no reagente Schiff por 3 – 4 horas). Os critérios usados para a análise de micronúcleo foram aqueles de Tolbert *et al.* (1992) e Titenko-Holland *et al.* (1998). Células sob processos degenerativos que podem produzir anomalias que dificultam a distinção de micronúcleo foram excluídas da análise. A qualidade das lâminas foram determinadas em um aumento de 200 vezes usando um microscópio Zeiss e a frequência de micronúcleo estimada baseado no número de células normais do esfoliado bucal, contadas usando um aumento de 1000 vezes no microscópio. Para cada indivíduo, 2000 células (1000 por lâmina) foram contadas.

4. Ensaio Cometa

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

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

5. Análise Estatística

As frequências gênicas e genóticas foram estimadas pela contagem, e Equilíbrio de Hardy-Weinberg foi testado com o teste do χ^2 . As análises estatísticas das diferenças de ID, FD e MN entre os diferentes genótipos foram realizadas com o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Todas as análises foram feitas utilizando o pacote estatístico SPSS15.0.

RESULTADOS:

As frequências genótípicas dos sistemas analisados estão de acordo com o Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

As tabelas 2 (TC) e 3 (TFS) apresentam a relação entre os genótipos e os resultados das análises com os biomarcadores de exposição e efeito (TC e MN).

Tabela 2. Efeito dos genótipos individuais nos diferentes biomarcadores de efeito e de exposição estudados (média \pm desvio padrão) em Trabalhadores de Curtumes.

Genótipos	Ensaio Cometa (200 leucócitos/indivíduo)		Micronúcleo (MN – 2000 células/indivíduo)
	Índice de Dano (ID – 0-400)	Frequência de Dano (FD – %)	
Grupo Não Exposto			
<i>OGG1 Ser/Ser</i>	3.22 \pm 3.01 (n=23)	1.28 \pm 1.06 (n=23)	6.00 \pm 4.01 (n=20)
<i>OGG1 Cys/ –</i>	2.46 \pm 3.53 (n=13)	0.96 \pm 1.42 (n=13)	5.00 \pm 2.65 (n=11)
<i>XRCC1 Arg/Arg</i>	3.16 \pm 3.46 (n=33)	1.44 \pm 1.95 (n=33)	5.79 \pm 3.74 (n=28)
<i>XRCC1 Arg/Trp</i>	2.80 \pm 2.28 (n=5)	1.30 \pm 1.10 (n=5)	4.40 \pm 1.67 (n=5)
<i>XPD 312 Asp/Asp</i>	3,92 \pm 2,87 (n=14) ^a	1,57 \pm 1,12 (n=14)	5,69 \pm 4,64 (n=13)
<i>XPD 312 Asn/ –</i>	1,73 \pm 2,10 (n=11)	0,82 \pm 0,90 (n=11)	4,70 \pm 2,06 (n=10)
<i>Rad51 G/G</i>	2,75 \pm 3,24 (n=32)	1,34 \pm 1,94 (n=32)	5,75 \pm 3,71 (n=28)
<i>Rad51 C/ –</i>	3,80 \pm 1,48 (n=5)	1,30 \pm 0,27 (n=5)	4,25 \pm 2,50 (n=4)
<i>XRCC4 Ile/Ile</i>	3,00 \pm 3,40 (n=34)	1,43 \pm 1,95 (n=34)	5,67 \pm 3,56 (n=30)
<i>XRCC4 Thr/ –</i>	3,40 \pm 2,51 (n=5)	1,20 \pm 0,67 (n=5)	4,50 \pm 3,11 (n=4)
Grupo Exposto			
<i>OGG1 Ser/Ser</i>	5.61 \pm 4.57 (n=23)	1.96 \pm 1.60 (n=23)	8.39 \pm 4.86 (n=23)
<i>OGG1 Cys/ –</i>	3.56 \pm 3.37 (n=14)	1.32 \pm 1.44 (n=14)	8.29 \pm 4.18 (n=14)
<i>XRCC1 Arg/Arg</i>	3.86 \pm 3.99 (n=36)	1.42 \pm 1.39 (n=36)	7.97 \pm 4.25 (n=36)
<i>XRCC1 Arg/Trp</i>	6.22 \pm 3.77 (n=9) ^b	2.33 \pm 1.60 (n=9) ^c	9.44 \pm 4.45 (n=9)
<i>XPD Asp/Asp</i>	4,63 \pm 4,30 (n=16)	1,75 \pm 1,59 (n=16)	8,50 \pm 4,31 (n=16)
<i>XPD Asn/ –</i>	4,62 \pm 3,43 (n=13)	1,54 \pm 1,25 (n=13)	6,92 \pm 3,52 (n=13)
<i>Rad51 G/G</i>	4,75 \pm 4,02 (n=44) ^d	1,69 \pm 1,45 (n=30) ^e	8,43 \pm 4,24 (n=44)
<i>Rad51 C/ –</i>	1,20 \pm 0,45 (n=5)	0,60 \pm 0,22 (n=5)	9,20 \pm 5,07 (n=5)
<i>XRCC4 Ile/Ile</i>	4,16 \pm 3,65 (n=38)	1,53 \pm 1,39 (n=38)	8,45 \pm 4,19 (n=38)
<i>XRCC4 Thr/ –</i>	7,15 \pm 5,80 (n=5)	2,10 \pm 2,22 (n=5)	8,20 \pm 5,63 (n=5)

- ^a Significante em relação ao genótipo variante (homozigoto e/ou heterozigoto) do mesmo grupo , P=0,041,
- ^b Significante em relação ao genótipo variante (homozigoto e/ou heterozigoto) do mesmo grupo , P=0,033,
- ^c Significante em relação ao genótipo variante (homozigoto e/ou heterozigoto) do mesmo grupo , P=0,047,
- ^d Significante em relação ao genótipo variante (homozigoto e/ou heterozigoto) do mesmo grupo , P=0,017,
- ^e Significante em relação ao genótipo variante (homozigoto e/ou heterozigoto) do mesmo grupo , P=0,036.

Tabela 3. Efeito dos genótipos individuais nos diferentes biomarcadores de efeito e de exposição estudados (média ± desvio padrão) em Trabalhadores de Fábricas de Sapato.

Genótipos	Ensaio Cometa	(200 leucócitos/indivíduo)	Teste Micronúcleo Linfócitos (2000 células/indivíduo)		Teste Micronúcleo Mucosa Oral (2000 células/indivíduo)
	Índice de Dano (ID – 0-400)	Frequência de Dano (FD – %)	MN	Ponte Citoplasmática	
Grupo Não Exposto					
<i>OGG1 Ser/Ser</i>	2.86 ± 2.65 (n=35)	1.19 ± 1.06 (n=35)	5.19 ± 2.44 (n=32)	3,22 ± 2,62 (n=32)	0,74 ± 0,93 (n=34)
<i>OGG1 Cys/ –</i>	2.54 ± 3.48 (n=13)	1.00 ± 1.40 (n=13)	4.27 ± 1.79 (n=11)	2,27 ± 1,62 (n=11)	0,67 ± 0,65 (n=12)
<i>XRCC1 Arg/Arg</i>	2.88 ± 2.99 (n=48)	1.36 ± 1.74 (n=48)	4.98 ± 2.36 (n=43)	2,98 ± 2,26 (n=43)	0,69 ± 0,81 (n=46)
<i>XRCC1 Arg/Trp</i>	2.80 ± 2.28 (n=5)	1.30 ± 1.10 (n=5)	4.40 ± 1.67 (n=5)	2,20 ± 3,27 (n=5)	1,00 ± 1,22 (n=5)
<i>XPB 312 Asp/Asp</i>	3,40 ± 2,66 (n=20)	1,48 ± 1,20 (n=20)	4,68 ± 1,97 (n=19)		
<i>XPB 312 Asn/ –</i>	1,71 ± 1,86 (n=14)	0,79 ± 0,80 (n=14)	4,69 ± 1,89 (n=13)		
<i>Rad51 G/G</i>	2,71 ± 2,99 (n=41)	1,34 ± 1,76 (n=41)	5,05 ± 2,39 (n=37)	2,76 ± 2,22 (n=37)	0,74 ± 0,88 (n=39)
<i>Rad51 C/ –</i>	2,73 ± 1,90 (n=11)	1,14 ± 1,10 (n=11)	4,30 ± 1,95 (n=10)	3,10 ± 2,85 (n=10)	0,64 ± 0,81 (n=11)
<i>XRCC4 Ile/Ile</i>	2,87 ± 3,01 (n=46)	1,40 ± 1,78 (n=46)	4,93 ± 2,16 (n=42)	2,86 ± 2,32 (n=42)	0,64 ± 0,80 (n=45)
<i>XRCC4 Thr/ –</i>	2,83 ± 2,64 (n=6)	1,00 ± 0,77 (n=6)	4,00 ± 2,92 (n=5)	3,80 ± 2,59 (n=5)	1,40 ± 1,14 (n=5)
Grupo Exposto					
<i>OGG1 Ser/Ser</i>	8.78 ± 7.13 (n=27)	2.93 ± 1.83 (n=27)	4.12 ± 2.80 (n=26)	3,08 ± 2,04 (n=26)	1,20 ± 1,50 (n=26)
<i>OGG1 Cys/ –</i>	7.60 ± 9.69 (n=10)	2.75 ± 2.32 (n=10)	5.80 ± 5.07 (n=10)	4,40 ± 2,91 (n=10)	0,78 ± 0,67 (n=12)

<i>XRCC1 Arg/Arg</i>	8.55 ± 8.27 (n=33)	2.80 ± 2.04 (n=33)	4.81 ± 3.68 (n=32)	3,63 ± 2,49 (n=32)	0,94 ± 1,26 (n=31)
<i>XRCC1 Arg/Trp</i>	8.00 ± 4.86 (n=6)	3.17 ± 1.72 (n=6)	3.00 ± 1.67 (n=6)	2,17 ± 0,98 (n=6)	1,67 ± 1,51 (n=6)
<i>XPD Asp/Asp</i>	9,80 ± 8,36 (n=20)	3,20 ± 2,12 (n=20)	4,00 ± 2,36 (n=20)		
<i>XPD Asn/ -</i>	9,00 ± 8,94 (n=9)	2,94 ± 1,98 (n=9)	4,78 ± 3,23 (n=9)		
<i>Rad51 G/G</i>	8,63 ± 8,43 (n=30)	2,92 ± 1,96 (n=30)	4,72 ± 3,90 (n=29)	3,24 ± 2,32 (n=29)	1,07 ± 1,24 (n=29)
<i>Rad51 C/ -</i>	7,89 ± 5,49 (n=9)	2,67 ± 2,15 (n=9)	3,89 ± 1,62 (n=9)	3,89 ± 2,57 (n=9)	1,00 ± 1,60 (n=8)
<i>XRCC4 Ile/Ile</i>	8,05 ± 7,16 (n=37)	2,81 ± 1,95 (n=37)	4,50 ± 3,58 (n=36)	3,39 ± 2,41 (n=36)	0,91 ± 1,12 (n=35)
<i>XRCC4 Thr/ -</i>	16,00 ± 18,38 (n=2)	3,75 ± 3,18 (n=2)	5,00 ± 1,41 (n=2)	3,50 ± 2,12 (n=2)	3,50 ± 2,12 (n=2) ^a

^a Significante em relação ao genótipo variante (homozigoto e/ou heterozigoto) do mesmo grupo , P=0,035.

1. Polimorfismos da via BER

No grupo não exposto dos trabalhadores de curtume, indivíduos com presença do alelo polimórfico *XRCC1*194Trp* apresentaram aumento significativo em ID e FD em relação aos indivíduos do mesmo grupo com o genótipo selvagem ($P = 0,033$ e $P = 0,047$, respectivamente). Os genótipos de *OGG1* não mostraram influência em nenhum dos outros biomarcadores (Tabela 3).

Nos trabalhadores de fábricas de sapato, os genótipos da via BER não apresentaram influência nos biomarcadores de exposição e de efeito, em nenhum dos grupos, indivíduos não expostos e expostos, não demonstrou nenhuma significância.

2. Polimorfismo da via NER

Nos trabalhadores de curtumes, foi observada uma diferença significativa nos índices de dano no grupo não-exposto ($P = 0,041$), sendo que indivíduos com o genótipo *Gln/* – apresentaram melhores resultados para este biomarcador. Entre os indivíduos expostos não foi observada nenhuma diferença significativa (Tabela 2).

Em relação aos trabalhadores de fábricas de calçados, não foi observada diferença nos níveis dos biomarcadores analisados e os genótipos *XPD*, tanto no grupo não exposto como no grupo exposto (Tabela 2).

3. Polimorfismo da via HR

Trabalhadores de curtume com o genótipo *Rad51 C/* – apresentou significativamente ID e FD menores em relação aos indivíduos do mesmo grupo com o genótipo *Rad51 G/G* ($P=0,017$ e $P=0,036$, respectivamente) (Tabela 2).

Já entre os trabalhadores de Fábricas de sapato, o genótipo *Rad51*135* não demonstrou influência nos níveis de ID, FD e MN.

4. Polimorfismo da via NHEJ

Nos trabalhadores de curtumes, os genótipos de *XRCC4*401* não apresentaram influência nas frequências de ID, FD e MN nos indivíduos não expostos e nos expostos (Tabela 2).

Já nos trabalhadores de fábrica de sapatos, os genótipos de *XRCC4* selvagem (*Ile/Ile*) tiveram frequências de MN em mucosa oral significativamente menores em relação aos indivíduos com a presença do alelo mutante (*Thr/ -*), com $P = 0,035$ (Tabela 3).

DISCUSSÃO

Os trabalhadores da indústria coureiro-calçadista estão continuamente expostos a diversos tipos de substâncias potencialmente genotóxicas e/ou carcinógenas.

Nos curtumes a exposição ocorre principalmente por ácidos e sais de cromo, fragmentos de couro, anilinas, tintas, lacas, solventes e fixadores. Apesar disto, a atividade não é classificada como causadora de câncer em humanos (IARC, 1987).

Em fábricas de calçados destacam-se a utilização de solventes orgânicos, *primers*, colas, adesivos e substâncias conhecidamente genotóxicas como o benzeno e o tolueno (Pitarque *et al.*, 1999; Uuksulainen *et al.*, 2002; Heuser *et al.*, 2007). Existe ainda, uma associação entre o aumento da incidência de câncer e a exposição ocupacional dos trabalhadores deste setor.

É importante lembrar que os estudos com biomarcadores ainda não nos dão informações precisas sobre o risco ocupacional, principalmente quando essa ocorre com misturas de diversas substâncias. Por exemplo, a quantidade do xenobiótico absorvido pelo organismo depende de diversos fatores, que fazem com que a taxa final de absorção varie muito, mesmo quando os indivíduos expostos trabalham em um mesmo setor (Norppa, 2001). Essa variação é considerada multifatorial e é consequência de diversas condições como estilo de vida, efeito da metabolização de determinados xenobióticos, reparo do DNA e suscetibilidade individual em resposta a exposições (Iamarcovai *et al.*, 2008).

Em relação à via NER, a qual repara danos que levam a distorções maiores, como dímeros de pirimidinas, grandes aductos e *crosslink* (pontes entre cadeias de DNA), foram estudados dois polimorfismos no gene *XP Lys751Gln*. Os resultados do trabalho não mostraram influência deste polimorfismo, considerando os diferentes genótipos, como efeito protetor de fixação de lesões que os xenobióticos dos setores analisados poderiam estar causando no DNA. Entretanto, no grupo não-exposto analisados como controles de trabalhadores de curtumes, foi encontrada uma diferença significativa ($P=0,041$) em relação ao ID, mostrando que os indivíduos com o genótipo *Gln/–* teriam um menor índice de dano. Com este resultado pode-se inferir que esses indivíduos que possuem o alelo mutante apresentam uma

maior proteção ao DNA em uma exposição cotidiana, mas quando ocorre exposição aos agentes estudados como solventes, sais de cromo, poeiras, tintas, etc., este não é o sistema que influencia na remoção mais eficiente das lesões.

A via BER está envolvida com a reparação de pequenas lesões como bases oxidadas ou reduzidas. Quanto ao gene *OGG1*, os resultados deste trabalho não mostraram uma influência dos polimorfismos a danos no DNA detectados pelo Ensaio Cometa e pelo Teste de Micronúcleo. Já em relação aos polimorfismos do gene *XRCC1*, foi observado que os trabalhadores de curtumes com o genótipo *XRCC1 Trp/–* tiveram um aumento significativo nos níveis de dano no DNA percebidos pelo Ensaio Cometa, comparados com aqueles com o genótipo *XRCC1 Arg/Arg*, mostrando um efeito protetor no genótipo *XRCC1* selvagem.

O polimorfismo do gene envolvido na via de HR, que repara quebras de fita dupla utilizando uma molécula como molde, *Rad51*G135C* está localizado na região 5'UTR do gene, podendo afetar a instabilidade do mRNA ou a eficiência de translocação para o citoplasma, bem como levar a alterações nos níveis ou na função da proteína (Poplawski *et al.*, 2006). O nosso estudo mostrou uma proteção significativa em trabalhadores de curtumes com genótipos *Rad51 C/–*, que apresentam o alelo mutante, a danos detectados pelo Ensaio Cometa.

A via de NHEJ é importante no reparo de quebras de fita dupla, fazendo a ligação de extremidades quebradas (Goode *et al.*, 2002; Costa & Menck, 2004). O polimorfismo desta via estudado neste trabalho foi o *XRCC4*Ile401Thr*. Nas análises apresentadas neste estudo, os genótipos com o alelo mutante *XRCC4*Thr* mostraram uma maior incidência de MN em mucosa oral, indicando uma menor atividade do alelo variante no reparo a danos provocados pela exposição à xenobióticos presentes em fábricas de sapato.

A capacidade de acumular danos ou repará-los é uma questão multifatorial, que envolve diversos sistemas e vias.

Os resultados demonstram que os danos detectados pelo Ensaio Cometa, principalmente danos oxidativos, quebras de fita simples e dupla, *crosslinks* DNA-DNA e DNA–proteína, causados pela exposição a substâncias

encontradas nos curtumes, são reparados preferencialmente pela via BER, que é responsável pela reparação de pequenas lesões como bases oxidadas ou reduzidas, e pela via HR, que atua no reparo de quebras de fita dupla. Enquanto que no reparo dos danos detectados no Teste de MN, clastogênese e aneugênese, provocados pela exposição ao ambiente de trabalho de fábricas de calçados, é a via NHEJ, que também atua no reparo de quebras de fita dupla.

REFERÊNCIAS

- Amorim LCA (2003) O Uso dos Biomarcadores na Avaliação da Exposição Ocupacional a Substâncias Químicas. *Rev. Bras. Med. Trab.* 1: 124-132.
- Associação Brasileira das indústrias de Calçados (ABICALÇADOS) (2009) Disponível On line: www.abicalcados.com.br.
- Au WW, Salama SA, Sierra-Torres CH (2003) Functional characterization of polymorphisms in DNA repair genes using cytogenetic challenge assay. *Environ Health Perspect* 111: 1843-1850.
- Bonassi S & Au WW (2002) Biomarkers in molecular epidemiology studies for health risk prediction. *Mutat Res* 511: 73–86.
- Bulbulyan MA, Changuina OV, Zaridze DG, Astashevsky SV, Colin D, Boffetta P (1998) Cancer mortality among Moscowshoe workers exposed to chloroprene (Russia). *Cancer Causes Control* 9: 381–387.
- Carrano, AV & Natarajan, AT (1988) Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques, International Commission for Protection against Environmental Mutagens and Carcinogens (ICPEMC publication 14). *Mutat Res* 204: 379-406.
- Cebulska-Wasilewska A (2003) Response to challenging dose of X-rays as a predictive assay for molecular epidemiology. *Mutat Res* 544: 289–297.
- Constantini SA, Merler E and Saracci R (1990) Epidemiologic studies on carcinogenic risk and occupational activities in tanning, leather and shoes industries. *Med Lav*, 81:184-211.
- Corrêa AR (2001) Complexo coureiro-calçadista Brasileiro, BNDES. Setorial, Rio de Janeiro, n. 14, PP. 65-91.
- Costa RM & Menck CF (2004) Genes de Reparo de DNA In: Ferreira CG & Rocha J C (Organizadores). *Oncologia Molecular*. Ed. Atheneu. São Paulo, pp 43-55.
- De Ruyck K, Van Eijkeren M, Claes K, Morthier R, De Paepe A, Vral A, De Ridder L, Thierens H (2005) Radiation-induced damage to normal tissues

after radiotherapy in patients treated for gynecologic tumors: association with single nucleotide polymorphisms in XRCC1, XRCC3, and OGG1 genes and in vitro chromosomal radiosensitivity in lymphocytes. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 62: 1140-1149.

Efferth T & Volm M (2005) Pharmacogenetics for individualized cancer chemotherapy. *Pharmacology & Therapeutics* 107: 155–176.

Environmental Protection Agency (EPA) (2002) Toxicological review of benzene. In: Support of Summary Information on the Integrated Risk Information (IRIS). U.S. Environmental Protection Agency, Washington. On line: <http://epa.gov/iris>

Fenech M, Titenko-Holland N, Chang WP, Zeige E, Bonassi S (1999) The Human Micronucleus Project – An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutat Res* 428: 271-283.

Gao WM, Romkes M, Day R, Siegfried JM, Luketich JD, Mady HH, Melhem MF, Keohavong P (2003) Association of the DNA repair gene *XPD* Asp312Asn polymorphism with p53 mutations in tobacco-related non-small cell lung cancer. *Carcinogenesis* 24: 1671-1676.

Goode EL, Ulrich CM, Potter JD (2002) Polymorphisms in DNA Repair Genes and Associations with Cancer Risk. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 11: 1513–1530.

Gorini APF and Siqueira SHG (1999) Complexo coureiro-calçadista nacional: uma avaliação do Programa de Apoio do BNDES. *Setorial*, Rio de Janeiro, n.9, pp. 95-134.

Guecheva TN & Henriques JAP (2003) Reparação de DNA em células Eucarióticas. In: Silva J, Erdtmann B, Henriques JPA (organizadores) *Genética Toxicológica*. Ed. Alcance. Porto Alegre, pp 225-247.

Hansen R, Saebo M, Skjelbred CF, Nexø BA, Hagen PC, Bock G, Bowitz Lothe IM, Johnson E, Aase S, Hasteen IL, Vogel U, Kure E H (2005) GPX Pro198Leu and OGG1 Ser326Cys polymorphisms and risk of development of colorectal adenomas and colorectal cancer. *Cancer Lett.* 229: 85-91.

- Hao B, Wang H, Zhou K, Li Y, Chen X, Zhou G, Zhu Y, Miao X, Tan W, Wei Q, Lin D, He F (2004) Identification of genetic variants in base excision repair pathway and their associations with risk of esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 64:4378-4384.
- Heuser, VD, Erdtmann B, Kvitko K, Rohr P, Silva J (2007) Evaluation of genetic damage in Brazilian footwear-workers: Biomarkers of exposure, effect, and susceptibility. *Toxicology* 232: 235–247.
- Iamarcovai G, Bonassi S, Botta A, Baan RA and Orsière T (2008) Genetic polymorphisms and micronucleus formation: A review of the literature. *Mutat Res* 658: 215-233.
- International Agency for Research on Cancer (IARC), Summaries & Evaluations (1987) Boot and shoe manufacture and repair. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risks of Chemicals to Humans, Suppl. 7, p. 232. IARC, Lyon, France.
- Ito H, Hamajima N, Takezaki T, Matsuo K, Tajima K, Hatooka S, Mitsudomi T, Suyama M, Sato S, Ueda R (2002) A limited association of OGG1 Ser326Cys polymorphisms for adenocarcinoma for the lung. *J Epidemiol* 12: 258-265.
- Jawad M, Seedhouse C, Russell N, Plumb M (2006) Polymorphisms in human homeobox HLX1 and DNA repair RAD51 genes increase the risk of therapy-related acute myeloid leukemia. *Blood* 108: 3916-3918.
- Keshava N & Ong T (1999) Occupational exposure to genotoxic agents. *Mutat Res* 437: 175–194.
- Kohno T, Shinmura K, Tosaka M, Tani M, Kim Sr., Sugimura H, Nohmi T, Kasai H, Yokota J (1998) Genetic polymorphisms and alternative splicing of the hOGG1 gene, that is involved in the repair of 8-hydroxyguanine in damaged DNA. *Oncogene* 16: 3219-3225.
- Lowry LK (1995) Role of biomarkers of exposure in the assessment of health risk. *Toxicol Letter* 124: 71-81.
- Lucas D, Ferrara R, Gonzáles E, Albores A, Manno M, Berthou F (2001) Cytochrome CYP2E1 phenotyping and genotyping in the evaluation of

- health risks from exposure to polluted environments. *Toxicology Letters* 124: 71–81.
- Lunn RM, Langlois RG, Hsieh LL, Thompson CL, Bell DA (1999) XRCC1 polymorphisms: effects on aflatoxin B1-DNA adducts and glycophorin A variant frequency. *Cancer Res* 59: 2557–2561.
- Lunn RM, Helzlsouer KJ., Parshad R, Umbach DM, Harris EL, Sanford KK, Bell DA (2000) XPD polymorphisms: effects on DNA repair proficiency. *Carcinogenesis*. 4:551-555.
- Maluf SW & Erdtmann B (2003) Reparação de DNA em células Eucarióticas. In: Silva J, Erdtmann B, Henriques JPA (organizadores) *Genética Toxicológica*. Ed. Alcance. Porto Alegre pp183-205.
- Marin MS, Lopez-Cima MF, Garcia-Castro L, Pascual T, Marron MG, Tardon A (2004) Poly (AT) polymorphism in intron 11 of the XPC DNA repair gene enhances the risk of lung cancer. *Cancer EpidemiolBiomarkers Prev*, 13:1788-1793.
- Marsin S, Vidal AE, Sossou M, Menissier-de Murcia J, Le Page F, Boiteux S, de Murcia G, Radicella JP (2003) Role of XRCC1 in the coordination and stimulation of oxidative DNA damage repair initiated by the DNA glycosylase hOGG1. *J Biol Chem* 278: 44068–44074.
- Mayan O, Pires A, Naves P and Capela F (1999) Shoe manufacturing and solvent exposure in northern Portugal. *Appl Occup Environ Hyg* 14: 785-790.
- National Occupation Research Agenda Team (NORA) (2003) Priorities for development of research in occupational cancer. *Environ Health Perspectiv*, 111:1-12
- Norppa H (2001) Genetic polymorphisms and chromosome damage. *Int J Environ Health* 204: 31-38.
- Omenn GS (1991) Future research directions in cancer ecogenetics. *Mutat Res* 247: 283-291.

- Pitarque M, Vaglenov A, Nosko M, Hirvonen A, Norppa H, Creus A, Marcos R, (1999) Evaluation of DNA damage by comet assay in footwear-workers exposed to toluene and other organic solvents. *Mutat. Res.* 441, 115–127.
- Pivetta F, Machado JMH, Araújo UC, Moreira MFR, Apostoli P (2001) Monitoramento biológico: conceitos e aplicações em saúde pública. *Cad. Saúde Pública*, 17: 545-554.
- Poplawski T, Arabski M, Kozirowska D, Blasinska-Morawiec M, Morawiec Z, Morawiec-Bajda A, Klupińska G, Jeziorski A, Chojnacki J, Blasiak J (2006) DNA damage and repair in gastric cancer—A correlation with the hOGG1 and RAD51 genes polymorphisms. *Mutat Res* 601: 83-91.
- Saffi J & Henriques JAP (2003) Reparação de DNA em células Eucarióticas. In: Silva J, Erdtmann B, Henriques JPA (organizadores) *Genética Toxicológica*. Ed. Alcance. Porto Alegre pp 271-305.
- Sbrana I, Caretto S and Battaglia A (1991) Chromosomal aberration analysis of workers in tannery industries. *Mutat Res* 242: 331-336.
- Siemiatycki J, Richardson L, Straif K, Latreille B, Lakhani R, Cambell S, Rousseau MC , Boffeta P (2004) Listing occupational carcinogens. *Environ Health Perspect* 112:1447-1459.
- Singh, NP, McCoy, MT, Tice, RR, Schneider, EL (1988). A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res* 175: 184-191.
- Somorovská M, Szabová E, Vodieká P, Tulinská J, Barancoková M, Fábry R, Lísková A, Riegerová Z, Petrovická H, Kubová J, Rausová K, Dusinská M and Collins A (1999) Biomonitoring of genotoxic risk in workers in rubber factoring: comparison of the Comet assay with cytogenetic methods and immunology. *Mutat Res* 445: 181-192.
- Stern MC, Umbach DM, van Gils CH, Lunn RM, Taylor JA (2001). DNA Repair Gene XRCC1 Polymorphisms, Smoking, and Bladder Cancer Risk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 10: 125–131.

Stupar J, Vrtovec M, Kocijancic A and Gantar A Chromium status of tannery workers in relation to metabolic disorders. *J. Appl Toxicol* 1999, 19:437-446.

Takezaki T, Gao CM, Wu JZ, Li ZY, Wang JD, Ding JH, Liu YT, Hu X, Xu TL, Tajima KI, Sugimura H (2002) hOGG1 Ser(326)Cys polymorphism and modification by environmental factors of stomach cancer risk in Chinese. *Int J Cancer* 99: 624-627.

Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF (2000) Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. *Environ Mol Mutagen* 35: 206-221.

Uuksulainen SO, Heikkila PR, Olkinuora PS, Kiilunen M (2002) Self-reported occupational health hazards and measured exposures to airborne impurities and noise in footwear repair work. *Int. J. Occup. Environ. Health* 6, 320–327.

van Hoffen A, Balajee AS, van Zeeland AA, Mullenders LHF (2003) Nucleotide excision repair and its interplay with transcription. *Toxicology* 193: 79–90.

Villela IV, Lau A, Silveira J, Pra D, Rolla HC, Silveira JD (2003). Reparação de DNA em células Eucarióticas. In: Silva J, Erdtmann B, Henriques JPA (organizadores) *Genética Toxicológica*. Ed. Alcance. Porto Alegre pp 140-163.

Wang WW, Spurdle AB, Kolachana P, Bove B, Modan B, Ebbers SM, Suthers G, Tucker MA, Kaufman DJ, Doody MM, Tarone RE, Daly M, Levavi H, Pierce H, Chetrit A, Yechezkel GH, Chenevix-Trench G, Offit K, Godwin AK, Struwing JP (2001). A single nucleotide polymorphism in the 5' untranslated region of RAD51 and risk of cancer among BRCA1/2 mutation carriers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 10:955-960.

Wilkinson J & Clapper ML (1997) Detoxification enzymes and chemoprevention. *Proceeding Society Experimental Biological Medicine* 216: 192-200.

World Health Organization. Environmental Health Criteria 222: Biomarkers in risk assessment: Validity and validation. International Program on Chemical Safety (IPCS). Genev. On-line: <http://www.ichem.org/documents/ehc/ehc/ehc222.html>. 2001.

Zaridze D, Bulbulyan M, Changuina O, Margaryan A and Boffeta P (2001)
Cohort studies of chloroprene-exposure workers in Russia. Chem Biol
Interact 135: 487-503.

ANEXO 1

Questionário pessoal

1. Idade: _____ em anos
2. Data de nascimento: ____/____/____
3. Sexo: ()M ()F
4. Grupo Étnico: () negro; () chinês; () japonês; () outros orientais; () indígena; () latino-americano; () europeu; () asiático
5. Estado civil: _____
6. N. de filhos: _____
7. Emprego anterior: _____
8. Função que exercia: _____
9. No seu emprego anterior já se expôs a algumas destas substâncias?
(informe tempo de exposição): () derivados do petróleo _____ ;
() tintas/corantes _____ ; () solventes _____ ; () pesticidas/herbicidas _____ ;
() mercúrio/vapores de outros metais pesados – quais? _____ ;
() outras substâncias químicas – quais? _____
10. Função atual: _____
11. Tempo de serviço: _____
12. No seu emprego atual já se expôs a algumas destas substâncias? (informe tempo de exposição): () derivados do petróleo _____ ; () tintas/corantes _____ ;
() solventes _____ ; () pesticidas/herbicidas _____ ; () mercúrio/vapores de outros metais pesados _____ ; () outras substâncias químicas _____
13. Utiliza equipamento de segurança: () sim () não _____
14. Você come durante o período de trabalho? () sim () não
15. Se sim, Lava as mãos antes de pegar nos alimentos? () sim () não
16. Já fumou? () sim () não – se não vá para 26
17. Quantos anos? _____
18. Ainda fuma? () sim () não – se não, há quantos anos parou? _____
19. Se sim, quantos cigarros por dia? () menos de meio maço; () de meio a um maço; () 1-2 maços; () mais de 2 maços
20. Fuma também: () cigarros de palha () cachimbo – quantas vezes ao dia: _
21. Medicamentos utilizados rotineiramente / indicar a freqüência: () vitaminas e suplementos; () pílulas para pressão; () antibióticos; () insulina; () tranqüilizantes; () relaxantes musculares; () outros: _____
22. Está fazendo algum tratamento? () sim () não – Qual? _____
23. Consome bebidas alcoólicas? () sim () não – Qual? Freqüência: _____
24. Ingere frutas e verduras? () sim () não – Qual? Freqüência: _____
25. Ingere carnes (não só vermelha)? () sim () não – Qual? Freqüência: _____
26. Preferência das carnes: () crua; () mal passada; () bem passada
() gorda; () magra
27. Doenças já contraídas: () câncer; () aids; () diabetes; () anemia; () doenças cardíacas; () outras _____
28. Tem conhecimento de algum defeito de nascimento ou doença hereditária que afetem seus pais, irmãos, irmãs ou cônjuges? () sim () não - _____
29. Você e cônjuge já tiveram dificuldades em conceber (mais de doze meses) ou já foram diagnosticados como estéreis? () sim () não - _____
30. Histórico de aborto espontâneo? () sim () não - _____
31. Histórico de bebês com defeitos? () sim () não - _____
32. Possui irmão gêmeo idêntico? () sim () não
33. Casos de câncer na família: () sim () não – grau de parentesco - _____
Tipos de cânceres: () pele; () mama; () leucemia; () esôfago; () outro _____