



**UNIVERSIADADE DO SAGRADO CORAÇÃO**

**DANIELE FERNANDES DA SILVA**

**ESTUDO DO POLIMORFISMO Lys<sup>751</sup>Gln NO GENE DE  
REPARO *xpd* EM INDIVÍDUOS EXPOSTOS A PESTICIDAS.**

**Bauru  
2007**



**UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO**

**ESTUDO DO POLIMORFISMO Lys<sup>751</sup>Gln NO GENE DE REPARO *xpd* EM INDIVÍDUOS EXPOSTOS A PESTICIDAS.**

Monografia de Iniciação Científica apresentada  
ao Centro de Ciências Biológicas e Profissões da Saúde,  
sob orientação da Profa. Dra. Magaly Machado Sales

**Bauru**  
2007

## FICHA CATALOGRÁFICA

S5861e	<p>Silva, Daniele Fernandes da.</p> <p>Estudo do polimorfismo L<sub>ys</sub><sup>751</sup> GLn no gene de reparo xpd em indivíduos expostos a pesticidas. / Daniele Fernandes da Silva. -- 2007. 42 f.</p> <p>Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra Magaly Machado Sales Monografia de Iniciação Científica (Ciências Biológicas) - Universidade do Sagrado Coração - Bauru - SP.</p> <p>1. Câncer 2. Gene xpd 3. pesticidas I. Sales, Magaly Machado II. Título.</p>
--------	--

**DANIELE FERNANDES DA SILVA**

**ESTUDO DO POLIMORFISMO LYS<sup>751</sup>GLN DO GENE DE REPARO  
xpd EM INDIVÍDUOS EXPOSTOS A PESTICIDAS**

Projeto de pesquisa do curso de Farmácia apresentado ao Centro de Ciências da Saúde, sob orientação da Prof. Dra Magaly Machado Sales.

Banca Examinadora:

---

---

---

Bauru, de de 2007.

Dedico este trabalho a Deus, à meus pais, anjos vigilantes, às minhas irmãs Jaqueline e Thais.

À Prof. Dra. Magaly, pela oportunidade, paciência e zelo, aos amigos de turma companheiros desta história, especialmente à companheira de pesquisa e grande amiga Jusciele, pelo carinho, companhia e amizade sincera e à Juliana, maravilhosa pessoa que esteve presente em momentos tão especiais.

Dedico também às minha tatas queridas, Júlia, Andreza e Tatiana, pela paciência, e anos de amizade incomparável e insubstituível. Aos funcionários e professores da Universidade do Sagrado Coração, trabalhadores rurais doadores de amostras. e a todos que de alguma forma, seja por meio do trabalho ou da presença sutil, fizeram parte desta história.

Agradeço a todos que estiveram envolvidos com este trabalho, aos doadores de amostras, professores da Universidade e em especial à Betiza, Wilson e Carolina pela grande contribuição neste trabalho.

## RESUMO

Os pesticidas são substâncias químicas designadas para o controle de pragas e doenças nos vegetais e sua aplicação tem contribuído significativamente para o aumento da produção agrícola. Os trabalhadores rurais expostos a pesticidas estão em contato direto com uma complexa mistura de substâncias químicas que podem contribuir para o desenvolvimento de câncer. A proteína XPD está envolvida com o reparo por excisão de nucleotídeos NER. Este tipo de reparo é uma das melhores formas para remover lesões no DNA, principalmente aquelas induzidas por adutos químicos. A genotipagem de indivíduos expostos pode indicar a frequência dos genótipos mais susceptíveis ao aparecimento de câncer. No presente trabalho foi analisado o polimorfismo Lys<sup>751</sup>Gln no gene de reparo *xpd* em 30 trabalhadores rurais expostos e 15 controles. Este polimorfismo está associado com um aumento da incidência de vários tipos de cânceres. A genotipagem deste fragmento foi realizada por PCR-RFLP e a restrição através da enzima *Pst*I. Foi possível verificar que de 30 indivíduos expostos 50,0% são heterozigotos para a mutação (Lys/Gln), 6,7% homozigotos (Gln/Gln) e 43,3% apresentaram o genótipo homozigoto tipo selvagem (Lys/Lys). Dos controles, 53,3% são heterozigotos para a mutação (Lys/Gln), 6,7% são homozigotos (Gln/Gln) e 40,0% apresentam o genótipo tipo selvagem (Lys/Lys). O teste estatístico de qui-quadrado ( $\chi^2 = 0,048$ ;  $p = 0,9762$ ) indica que a distribuição dos genótipos parece não diferir entre os grupos estudados. Porém, o genótipo Lys/Gln foi o mais frequente tanto no grupo exposto como no controle, determinando a necessidade de uma análise da instabilidade cromossômica e uma orientação esclarecida aos trabalhadores expostos a pesticidas (31 referências).

**Palavras-chave:** câncer, gene *xpd*, pesticidas

## ABSTRACT

Pesticides are chemicals used to control plagues and diseases in vegetables, and their application have contributed significantly with increased agricultural production. Rural workers exposed to pesticides are in contact with a complex mixture of chemicals that may contribute for cancer development. The XPD protein is involved with repair by excision of NER nucleotides. This kind of repair is one of the best ways to remove DNA lesions, mainly the ones induced by chemicals. Exposed individuals genotyping may indicate the frequency of the most susceptible genotypes to cancer development. In the present work the polymorphism Lys715Gln was analyzed on the repair gene *xpd* in 30 rural workers and 15 controls. This polymorphism is associated with an increase in the incidence of several kinds of cancers. The genotyping of this fragment was performed by PCR-RFLP and the restriction, through the enzyme PstI. It was possible to check that among the 30 exposed individuals, 50% of them heterozygotes for mutation (Lys/Gln), 6.7% homozygotes (Gln/Gln) and 43.3% presented the wildtype homozygote genotype (Lys/Lys). Among the controls, 53.3% are heterozygotes for mutation (Lys/Gln), 6.7% are homozygotes (Gln/Gln), and 40% presented the wildtype genotype (Lys/Lys). The chi square statistic test ( $\chi^2=0.048$ ;  $p=0.9762$ ) indicates that genotypes distribution seems not to differ among the studied groups.

However, the Lys/Gln genotype was the most frequent one, both on the exposed group and on the control one, determining the need for an analysis on chromosomic instability and guided instruction for the rural workers exposed to pesticides. (31 references).

**Key Words:** cancer, *xpd* gene, pesticides.

## LISTA DE ABRERVIATURAS

DNA	Ácido desoxirribonucléico.
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético.
NaCl	Cloreto de sódio
PCR	Reação em cadeia da polimerase.
P1000	Micropipeta de volume ajustável entre 100 e 1000 $\mu$ l.
RFLP	Polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição.
RPM	Rotação por minuto.
SDS 10%	Detergente iônico dodecil sulfato de sódio.
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine.
TEB	Tampão tris EDTA borato.
TKM1	Solução de hemólise composta por Tris HCl, KCl e MgCl <sub>2</sub> .
TKM2	Solução para lise de leucócitos composta por Tris HCl, KCl, MgCl <sub>2</sub> e EDTA.
UV	Ultra violeta

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	09
POLIMORFISMO NO GENE <i>xpd</i> E A SUSCETIBILIDADE AO CÂNCER.....	11
MATERIAL E MÉTODOS.....	14
RESULTADOS.....	19
DISCUSSÕES.....	28
CONCLUSÕES.....	30
REFERÊNCIAS.....	31
BIBLIOGRAFIA CONSULTADA.....	36
APÊNDICES .....	39

## INTRODUÇÃO

Os pesticidas constituem uma categoria heterogênea de substâncias químicas especificamente designadas para o controle de pestes e doenças nos vegetais. Sua aplicação tem contribuído significativamente para o aumento da produção agrícola. A maioria das pessoas são inevitavelmente expostas aos pesticidas através da contaminação ambiental, uma vez que uma grande parte de seus componentes ficam no meio ambiente por muitos anos, afetando a água, o ar, o solo, os alimentos e provocando danos à saúde humana, principalmente daqueles potencialmente expostos em seu ambiente de trabalho, incluindo aplicadores e trabalhadores de fábricas destes químicos.

Os trabalhadores rurais expostos aos pesticidas estão em contato direto com uma complexa mistura de diferentes tipos de substâncias químicas que além de serem defensivos agrícolas, induzem instabilidades cromossômicas, principalmente deleções, translocações e ganho ou perda de cromossomos inteiros, contribuindo para o desenvolvimento de câncer (BOLOGNESI, 2003).

O câncer é uma doença que pode ser atribuída a múltiplos fatores, incluindo contribuição genética, meio ambiente e estilo de vida. A exposição a pesticidas é um fator ambiental relevante, devido à sua associação com o desenvolvimento da doença. Entretanto, estudos epidemiológicos que relacionam exposição a pesticidas e câncer humano têm obtido resultados incertos. Os inseticidas, herbicidas e fungicidas estão associados com câncer hematopoiético, de próstata, pâncreas, fígado, pulmão, ovário, mama, testículo, rim, cérebro e outros (KUSHIK et al., 2005). Este risco não se restringe somente à exposição direta aos pesticidas, podendo também afetar indivíduos indiretamente envolvidos como os familiares de trabalhadores rurais (KUSHIK et al., 2005).

Os polimorfismos em genes de reparo de DNA podem afetar a função das proteínas e a capacidade individual de reparar danos no DNA, levando a uma instabilidade genética e alguns tipos de cânceres como: glioma, bexiga, mama, esôfago, pulmão, próstata, pele, cabeça, pescoço e estômago. Alguns estudos que relacionam mutações de ponto em genes de reparo e câncer têm apresentado resultados não significativos, devido ao pequeno número de indivíduos analisados. Dufloth et al. (2005) estudaram o polimorfismo Lys<sup>751</sup>Gln em uma amostra de 261 mulheres com câncer de mama ou com histórico na família 120 controles, e não encontraram diferenças estatísticas entre os grupos estudados. Entretanto, a análise de múltiplos genes podem ajudar a esclarecer a associação do câncer com tais polimorfismos, tempo de exposição aos pesticidas e capacidade de reparo do DNA (GOODE et al., 2002).

Danos nos cromossomos induzidos por pesticidas aparecem tanto na exposição contínua como na exposição descontínua, mas é cumulativa na exposição contínua a esta complexa mistura de substâncias químicas. Danos nos cromossomos, cromátides e micronúcleos têm sido detectados na maioria dos estudos que envolvem genotoxicidade dos pesticidas através da análise citogenética (BOLOGNESI, 2003).

A utilização de pesticidas para controlar as doenças nas lavouras é um fato inegável, porém os cuidados com o seu manuseio são negligenciados. O presente trabalho teve como objetivo analisar as freqüências dos genótipos do gene *xpd* em trabalhadores rurais expostos a pesticidas de três municípios do interior do estado de São Paulo (Bauru, Braúna e Itajobi) e controles para determinar a suscetibilidade ao desenvolvimento de câncer. A genotipagem foi realizada pela metodologia PCR-RFLP (Polismorfismo de comprimento fragmento de restrição) e a significância das freqüências encontradas foi feita utilizando o teste do qui-quadrado.

## **POLIMORFISMO NO GENE *xpd* E A SUSCETIBILIDADE AO CÂNCER**

A primeira síndrome humana caracterizada como um distúrbio de deficiência para uma via de reparo de DNA foi o xeroderma pigmentosum (XP), que envolve sete genes: XPA a XPG (COSTA, R. et al., 2004). O gene do xeroderma pigmentoso *xpd* está localizado no cromossomo 19 q13.3 e possui 23 éxons e cerca de 54.000 pares de bases (WEBER et al. 1990), sendo seu cDNA composto de 2.400 nucleotídeos. Este gene produz uma proteína de 760 aminoácidos com peso molecular de 86.900 daltons e atividade helicase (SCHAEFFER et al., 1994).

A proteína XPD é o centro da transcrição do fator IIIH, a qual está envolvida com o reparo por excisão de nucleotídeos NER, do inglês *Nucleotide Excision Repair*. Este tipo de reparo é uma das melhores formas para remover lesões no DNA, principalmente aquelas induzidas pelo cigarro, fotoprodutos produzidos por UV e adutos químicos. Esta proteína é absolutamente necessária para o reparo de excisão de nucleotídeos. Uma vez que uma lesão no DNA tenha sido reorganizada por proteínas específicas, a atividade helicase do XPD com ação reparadora, juntamente com o grupo B helicase do xeroderma pigmentoso, faz com que dupla hélice do DNA se abra para que a área lesada possa ser cortada e a parte danificada do DNA removida. A isso segue-se a inativação da transcrição de RNA pela RNA polimerase II. A atividade do *xpd* é essencial para a vida, sendo que a total ausência deste gene resulta em letalidade embrionária (FRIEDBERG, E.C., 2004).

Polimorfismos nesse gene podem afetar essa capacidade e predispor ao desenvolvimento de vários tipos de cânceres. Sete polimorfismos nos éxons 6, 8, 10, 17, 22 e 23 no gene *xpd* têm sido identificados por seqüenciamento de DNA humano. Três destes polimorfismos resultam em aminoácidos mutados. Os polimorfismos nos códons 199, 201 e 575 são raros e nos códons 156, 312, 711 e

751 são comuns (BROUGHTON B. C., STEINGRIMSDOTTIR H., LEHMANN A.R.1996; SHEN M.R., JONES I.M., MOHRENWEISER H. 1998; MOHRENWEISER H.W. et al., 2002).

Dufloth et al. (2005) estudaram o polimorfismo Lys<sup>751</sup>Gln em 53 mulheres com câncer de mama com histórico na família, 33 mulheres com câncer de mama esporádico, 175 mulheres com histórico na família que não apresentaram câncer de mama e 120 controles sem câncer de mama e sem histórico familiar, e não encontraram diferenças estatísticas entre os grupos estudados. Outro estudo que mostrou a frequência deste polimorfismo na população brasileira foi realizado com 364 indivíduos saudáveis separados por etnia (ancestrais europeus e africanos), e mostrou que a frequência deste genótipo foi significante maior na população branca do que na população negra (Canalle et al., 2006).

Dois polimorfismos no *xpd* (Asp<sup>312</sup>Asn, éxon 10 e Lys<sup>751</sup>Gln, éxon 23) têm sido associados ao câncer de pulmão (DUEL E.J. et al.,2000; PALLI D. et al., 2001; SPITZ M.R. et al., 2001; HOU S.M. et al., 2002; QIAO Y. et al., 2002; TANG D. et al., 2002; MATULLO G. et al., 2003). Zhou et al. (2003) relataram também uma associação entre o uso crônico de cigarro e polimorfismos nos genes *xrcc1* (Arg<sup>399</sup>Gln) e *xpd* (Asp<sup>312</sup>Asn e Lys<sup>751</sup>Gln) com este tipo de câncer.

Indivíduos com câncer de pele apresentam pelo menos uma cópia do alelo Gln do *xpd*, que aumenta o risco de desenvolvimento de cânceres secundários como o de próstata, pulmão e mama (BREWSTER et al.,2004). Segundo Rybicki et al. (2004) o alelo Asn do *xpd* pode exercer um efeito positivo modesto no risco de câncer de próstata quando duas cópias deste alelo estão presentes (Asn/Asn), e este efeito é aumentado pelo genótipo Gln/Gln do XRCC1.

Tomescu et al. (2001) relataram que o polimorfismo Lys<sup>751</sup>Gln do *xpd*, detectado em um grupo de indivíduos com melanoma reduz a capacidade de reparo do DNA, e concluíram que tal polimorfismo pode ser a causa do melanoma.

Yeh et al. (2005) associaram polimorfismos nos genes de reparo *xrcc1* (Arg<sup>399</sup>Gln), *xrcc3* (Thr<sup>241</sup>Met) e *xpd* (Lys<sup>751</sup>Gln) com o risco de câncer colo retal em uma amostra da população de Taiwan. Os resultados sugeriram que estes polimorfismos podem induzir a este tipo de câncer, particularmente, o desenvolvimento de câncer retal em pacientes jovens desta população.

Yang et al. (2005) estudaram uma possível associação entre os genes GLTSCR1 (éxon 1) e *xpd* (éxon 22) com o desenvolvimento de oligodendrogliomas e concluíram que somente o *gltscri1* estava associado com o início e progressão deste carcinoma.

Yu et al. (2004) concluíram que o genótipo Gln/Gln do *xpd* pode ser um fator contribuinte para o risco de carcinoma de células escamosas do esôfago e este risco pode ser aumentado com a exposição ambiental. Entretanto, o polimorfismo Asp<sup>312</sup>Asn do *xpd* não contribuiu para o desenvolvimento deste câncer.

Alguns polimorfismos no gene *xpd* não estão relacionados com o risco de desenvolvimento de câncer. Xing D et al. (2002) obtiveram resultados negativos no estudo de associação entre os polimorfismos Asp<sup>312</sup>Asn e Lys<sup>751</sup>Gln do *xpd* e o risco de carcinoma de células escamosas do esôfago em uma amostra da população chinesa.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **MATERIAL**

Foram utilizadas 30 amostras de sangue periférico provenientes de indivíduos envolvidos no cultivo de laranja, limão, tomate, morango, pimentão, arroz, flores, café, abacate, cana de açúcar, milho, abacaxi, uva, maracujá, algodão, amendoim, soja, hortaliças, feijão, banana, goiaba, vagem, cenoura, quiabo e abóbora nas regiões de Bauru, Braúna e Itajobi do estado de São Paulo.

Na região de Bauru foram coletadas amostras de 15 trabalhadores expostos a pesticidas no laboratório de análises clínicas (LAC) da Universidade do Sagrado Coração (USC). Na região de Braúna foram coletadas amostras de 10 trabalhadores rurais e na região de Itajobi de mais cinco indivíduos, no posto de saúde das cidades.

Todos os indivíduos forneceram informações relativas ao hábito de fumar, ingestão de bebida alcoólica, hábitos alimentares e tempo de exposição a defensivos agrícolas (fungicidas, herbicidas e inseticidas) e assinaram o protocolo de “consentimento informado”.

Como grupo controle foram obtidas 15 amostras de indivíduos não expostos, seguindo-se os mesmos procedimentos de coleta e entrevista. Deste grupo todos são provenientes de Bauru e região, escolhidos de acordo com a idade, dentro de uma variação de mais ou menos dois anos.

De cada indivíduo foram coletados 5 ml de sangue periférico em seringas e “vacutainers” descartáveis, conservados com EDTA.

## **MÉTODOS**

### **ANÁLISE MOLECULAR**

#### **LISE DE GLÓBULOS VERMELHOS**

Para separar o plasma, o sangue foi centrifugado durante cinco minutos a 3.000 rpm. A seguir, desprezado 1ml do plasma e o restante da amostra transferido para um tubo do tipo falcon de 15 ml estéril adicionando, posteriormente, a solução de lise (9 ml de cloreto de amônia 0,144 M e 1 ml de bicarbonato de amônia 0,01 M) na proporção 1 ml de sangue para 1 ml da solução de lise . O material permaneceu em agitação (60 rpm) durante 25 minutos a temperatura ambiente, seguindo com uma centrifugação durante 15 minutos a 3.000 rpm. O sobrenadante foi desprezado, deixando apenas 1 ml de amostra em cada tubo. Posteriormente, acrescentou-se mais 3 ml da solução de lise, homogeneizando com auxílio de uma P1000 seguindo centrifugação durante 10 minutos a 3.000 rpm. O sobrenadante foi desprezado novamente deixando cerca de 1,5 ml seguindo com homogeneização com auxílio de uma P1000. Essas amostras foram transferidas para um tubo tipo “ependorf” estéril previamente identificado. Em seguida, centrifugação das amostras durante 3 minutos a 4.000 rpm e o sobrenadante desprezado. Após esta etapa, acrescentou-se 1 ml da solução de lise com homogeneização e posterior centrifugação durante 3 minutos a 4.000 rpm. O sobrenadante foi novamente desprezado, desta vez com acréscimo de 1 ml de TKM1, seguindo a homogeneização da solução com auxílio de uma P1000 e centrifugação durante 2

minutos a 3.000 rpm . Feito isso, o sobrenadante foi mais uma vez desprezado e as amostras armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## **EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO**

Ao “pellet” de glóbulos brancos adicionou-se 800  $\mu\text{l}$  de TKM-2 e 50  $\mu\text{l}$  de SDS 10% com homogeneização no agitador (Phoenix) por 3 segundos. As amostras foram incubadas a  $55^{\circ}\text{C}$ , em banho-maria, durante 1 hora com agitação (Phoenix) a cada 10 minutos. Em seguida, adicionou-se 360  $\mu\text{l}$  de NaCl 5M com posterior homogeneização e centrifugação durante 5 minutos a 13.000 rpm. Feito isso, o sobrenadante foi desprezado cuidadosamente e transferido para um tubo de hemólise estéril, onde foi precipitado com 2 volumes de etanol absoluto gelado. O tubo é vedado com parafilme e invertido por várias vezes até a precipitação do DNA. O DNA foi transferido com o auxílio de uma P1000 para um tubo tipo eppendorf estéril previamente identificado, juntamente com 500  $\mu\text{l}$  do etanol do tubo de hemólise e centrifugado a 12.000 rpm por 3 minutos. O sobrenadante foi desprezado e adicionou-se 1ml de etanol 70 % gelado. Para finalizar, as amostras foram centrifugadas durante 3 minutos a 12.000 rpm e o sobrenadante novamente desprezado. O “pellet” de DNA obtido por este processo foi deixado à temperatura ambiente a fim de secar, durante aproximadamente 12 horas.

## **DILUIÇÃO DO DNA**

Aos “pellets” de DNA obtidos pela extração, foram adicionados 100  $\mu\text{l}$  de água livre de DNases e RNases e as amostras, incubadas no banho-maria a  $55^{\circ}\text{C}$

durante 10 minutos. Os “pellets” diluídos foram armazenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento do uso.

## **VERIFICAÇÃO DA QUALIDADE DO DNA**

Para verificação da qualidade do DNA foi realizada a eletroforese em gel de agarose 1% e a quantificação por espectrofotometria, por leitura da absorbância a 260nm. No final as amostras de DNA foram diluídas com água livre de DNases e RNases até uma concentração de  $10\text{ng}/\mu\text{l}$ , para serem utilizadas nas reações de amplificação.

## **GENOTIPAGEM**

Para amplificar o éxon 23 do gene *xpd* ( $\text{Lys}^{751}\text{Gln}$ ) foram sintetizados primers de acordo com Au et al. (2005): *forward* 5'-CTGCTCAGCCTGGAGCAGCTAGAATCAGAGGACGCTG- 3' e *reverse* 5'-AAGACCTTCTAGCACCACCG-3'. A ciclagem programada no termociclador teve uma desnaturação inicial de  $95^{\circ}\text{C}$  por 2 minutos, seguida de 40 ciclos de  $94^{\circ}\text{C}$  por 15 segundos,  $67^{\circ}\text{C}$  por 30 segundos e  $72^{\circ}\text{C}$  por 45 segundos, seguidos de uma extensão final de  $72^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos.

## **RESTRICÇÃO**

Após a PCR foi realizada a digestão enzimática por PCR-RFLP (polimorfismo de comprimento de restrição) dos fragmentos amplificados para genotipagem do polimorfismo do gene *xpd*  $\text{Lys}^{751}\text{Gln}$ , utilizando a enzima *Pst I*.

## **ELETROFORESE**

Os produtos do PCR foram submetidos a eletroforese em agarose 0.9% em TEB 0.5X (tampão tris-EDTA-borato), a 110 volts, amperagem livre, por 50 minutos, usando o marcador de peso molecular 1Kb plus. A coloração foi feita com o brometo de etídio a 5%. A visualização dos fragmentos realizou-se em um transiluminador UV, sendo as imagens dos géis fotografadas e armazenadas.

Os produtos da restrição foram revelados por eletroforese em poliacrilamida 6%, utilizando persulfato de amônio a 10% , TEMED e TEB 1X (tampão tris-EDTA-borato). Foi adicionado às amostras azul de bromofenol 1X e o marcador de peso molecular utilizado foi Ø174 Hae III digest. A corrida teve duração de 60 minutos a 70 volts e amperagem livre. Para corar o gel utilizou-se brometo de etídio e a visualização também realizou-se em transiluminador UV, sendo as imagens fotografadas (foto documentador de géis Alpha Imager EC) e armazenadas

## **ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Para verificar se existe significância entre os resultados obtidos dos expostos e dos controles, foi aplicado o teste de qui-quadrado.

## **RESULTADOS**

Foram realizadas as aplicações dos questionários, coleta de sangue periférico, lise de glóbulos vermelhos, extração de DNA genômico, verificação da qualidade do DNA através da eletroforese em gel de agarose e espectrofotometria, PCR do gene *xpd 751* e a restrição dos indivíduos expostos e dos controles.

A tabela 1 refere-se aos dados de 30 trabalhadores rurais expostos a pesticidas, oriundos da aplicação de questionários.

**Tabela 1**

Dados referentes ao tempo de trabalho na lavoura, tempo de aplicação de pesticidas, hábito de fumar, ingestão de álcool, idade e sexo.

Indivíduo	Tempo de trabalho na lavoura (anos)	Tempo de aplicação de pesticidas (anos)	Idade (anos)	Fumo*	Álcool*	Sexo**
E01	53	30	64	-	+	M
E02	40	40	59	-	+	M
E03	45	30	58	-	+	M
E04	40	4	55	+	+	M
E05	15	15	66	+	+	M
E06	21	5	36	+	+	M
E07	8	4	32	-	+	M
E08	30	30	53	+	+	M
E09	12	12	33	-	+	M
E10	8	3	26	-	+	M
E11	2	2	24	-	-	M
E12	50	45	62	-	+	M
E13	4	~1	23	-	+	M
E14	48	30	57	-	-	M
E15	25	2	43	+	+	M
E16	16	8	26	-	-	M
E17	36	36	56	-	+	M
E18	27	27	45	+	+	M
E19	29	20	42	+	+	M
E20	30	25	44	-	+	M
E21	5	5	17	+	-	M
E22	40	20	54	-	+	M
E23	20	10	49	+	+	M
E24	20	15	54	-	+	M
E25	14	9	27	-	-	M
E26	1	1	21	-	-	M
E27	19	19	33	-	+	M
E28	5	5	27	-	+	M
E29	20	15	40	-	-	M
E30	10	~ 4	37	-	-	M

\* (-) não fumante e não ingere álcool; (+) fumante e ingere álcool. \*\* (M) sexo masculino

A tabela 2 refere-se aos dados de 15 controles, oriundos da aplicação de questionários.

**Tabela 2**

---

Dados referentes ao tempo de trabalho na lavoura, tempo de aplicação de pesticidas, hábito de fumar, ingestão de álcool, idade e sexo.

---

Indivíduo	Tempo de trabalho na lavoura	Tempo de aplicação de pesticidas	Idade(anos)	Fumo*	Bebida*	Sexo**
C01	0	0	41	-	+	M
C02	0	0	57	-	+	M
C03	0	0	44	+	+	M
C04	0	0	24	-	-	M
C05	0	0	21	+	+	M
C06	0	0	33	-	-	M
C07	0	0	27	-	-	M
C08	0	0	56	+	+	M
C09	0	0	27	-	+	M
C10	0	0	36	+	+	M
C11	0	0	19	-	-	M
C12	0	0	52	-	+	M
C13	0	0	49	-	+	M
C14	0	0	49	-	+	M
C15	0	0	42	-	+	M

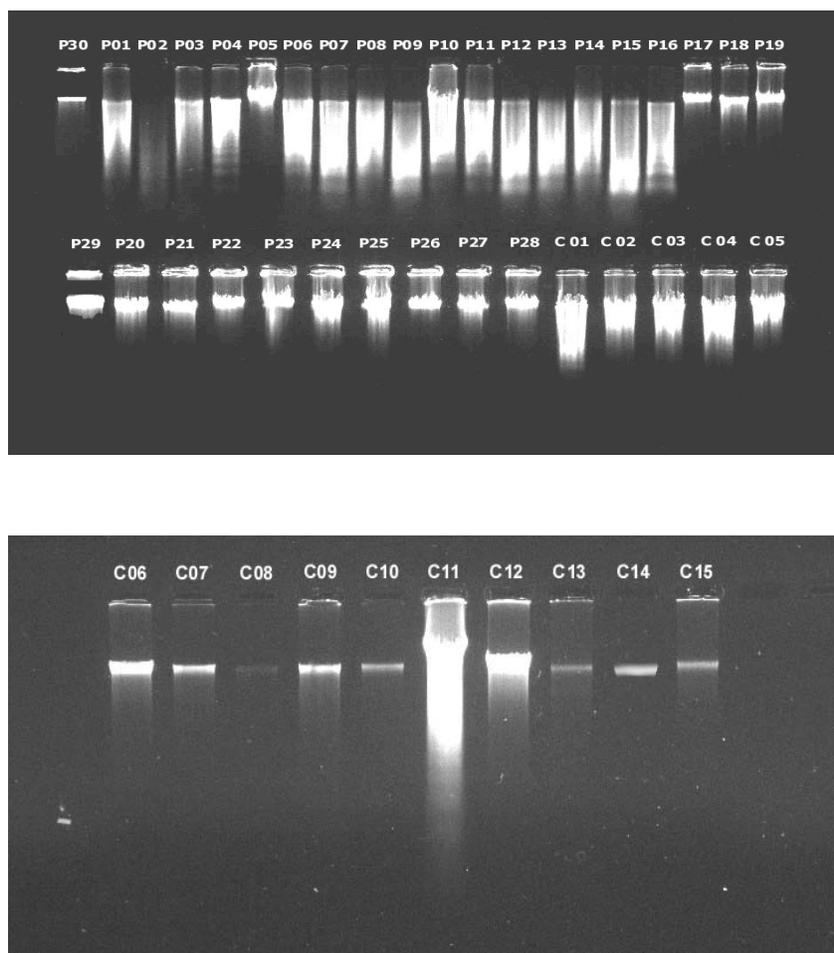
---

\* (-) não fumante e não ingere álcool; (+) fumante e ingere álcool. \*\* (M) sexo masculino

Com a verificação da qualidade do DNA em gel de agarose 1% (Figura 1), foi possível verificar que as amostras P01 a P16, exceto a amostra P05 apresentam-

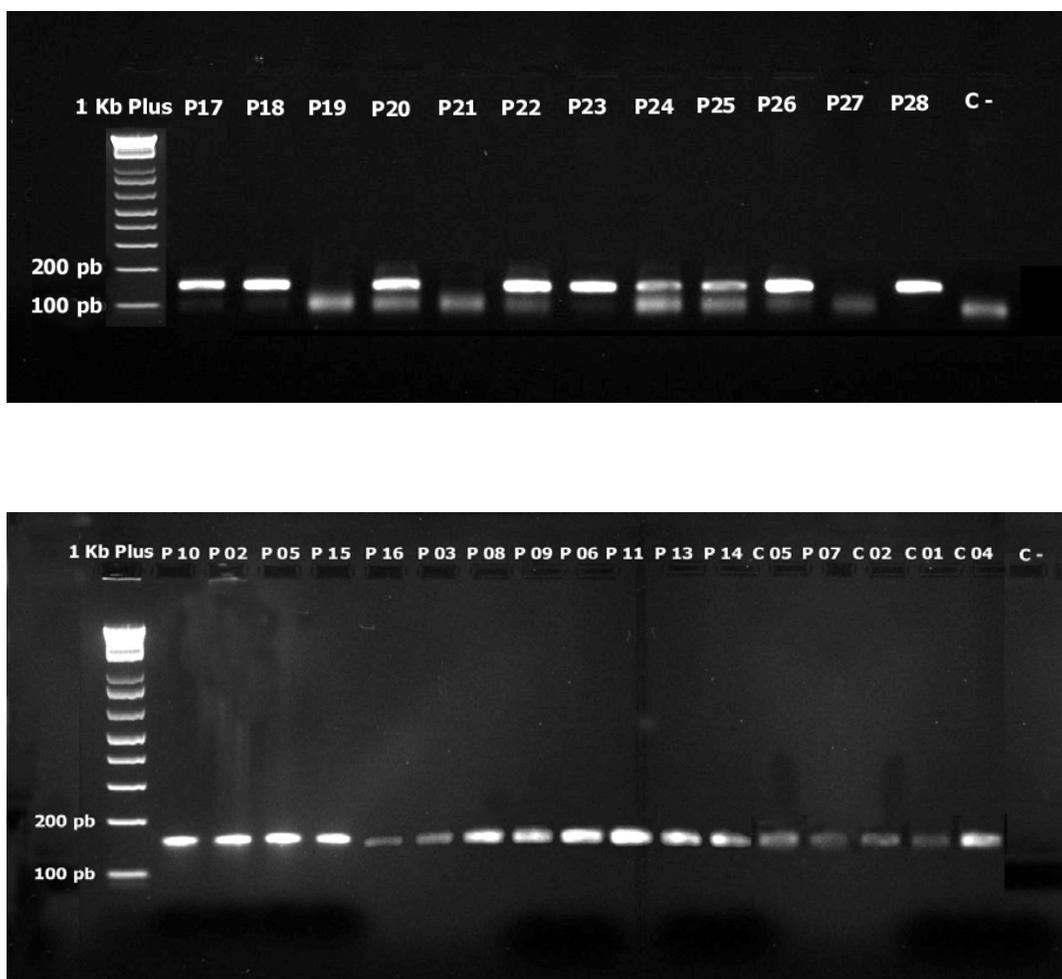
se aparentemente degradadas em relação às demais, provavelmente devido ao método de extração de DNA e ao tempo de armazenamento dessas amostras a -20°C. Entretanto, esta aparente degradação não interferiu na positividade das reações de PCR.

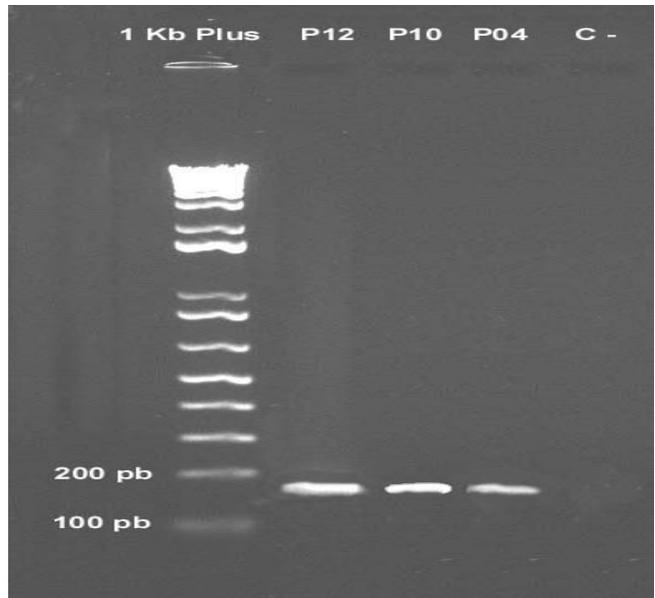
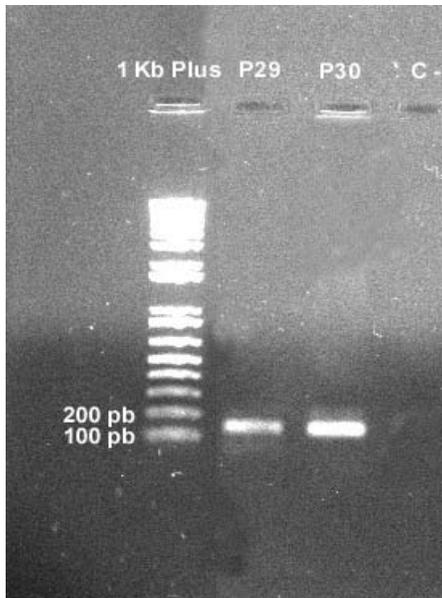
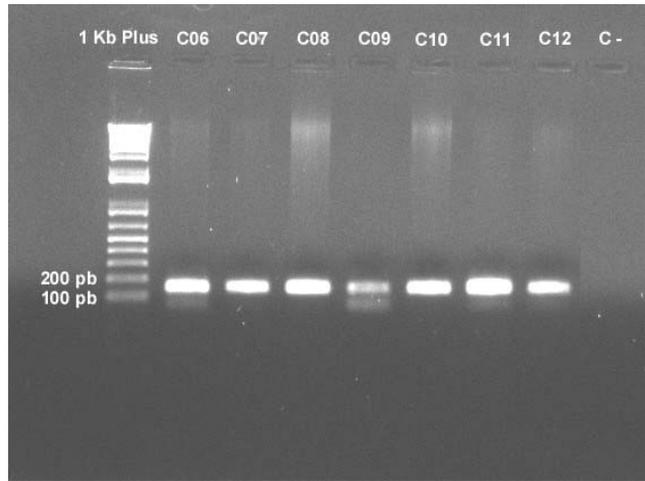
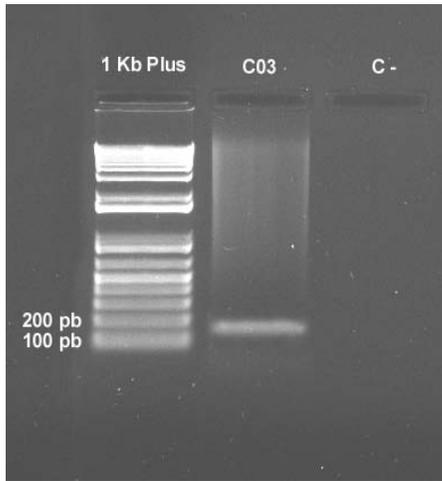
**Figura 1.** Verificação da qualidade das amostras de DNA genômico total em gel de agarose 1%. A letra P representa o grupo exposto e a letra C refere-se ao grupo controle.



Dos produtos da PCR (Figura 2), os que não amplificaram na primeira reação (P19, P21 e P27)) foram repetidos nas reações seguintes com aumento da concentração final de DNA, de acordo com a quantificação das amostras realizada pela Faculdade de Medicina de Botucatu - Divisão de Hemocentro . Dessa forma foi possível obter a amplificação do fragmento do gene *xpd* (161 pb) de todos os indivíduos estudados.

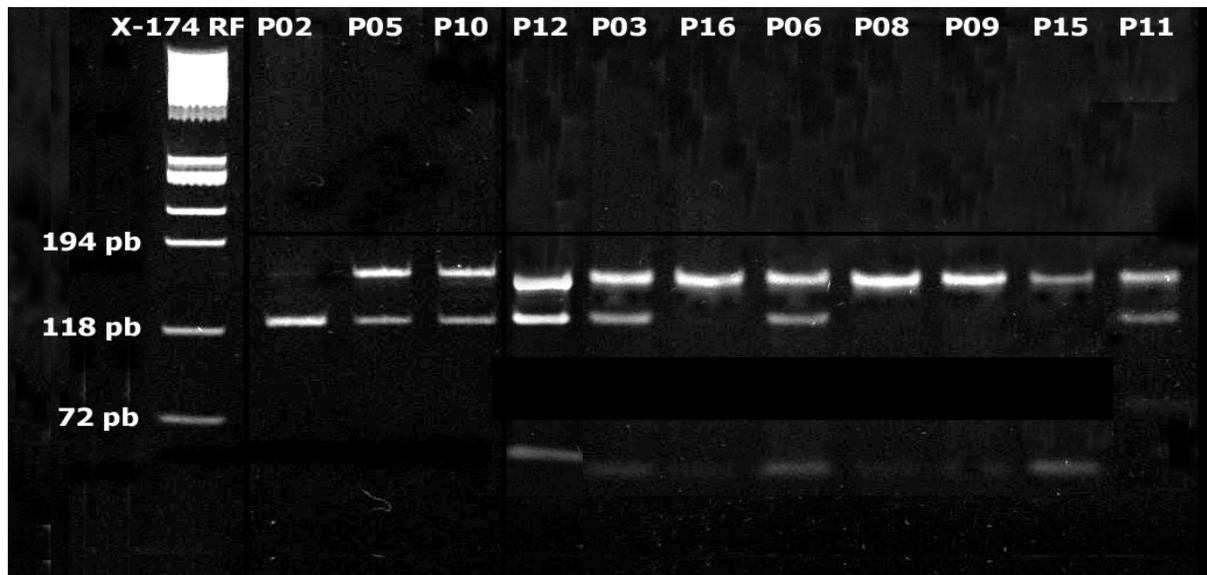
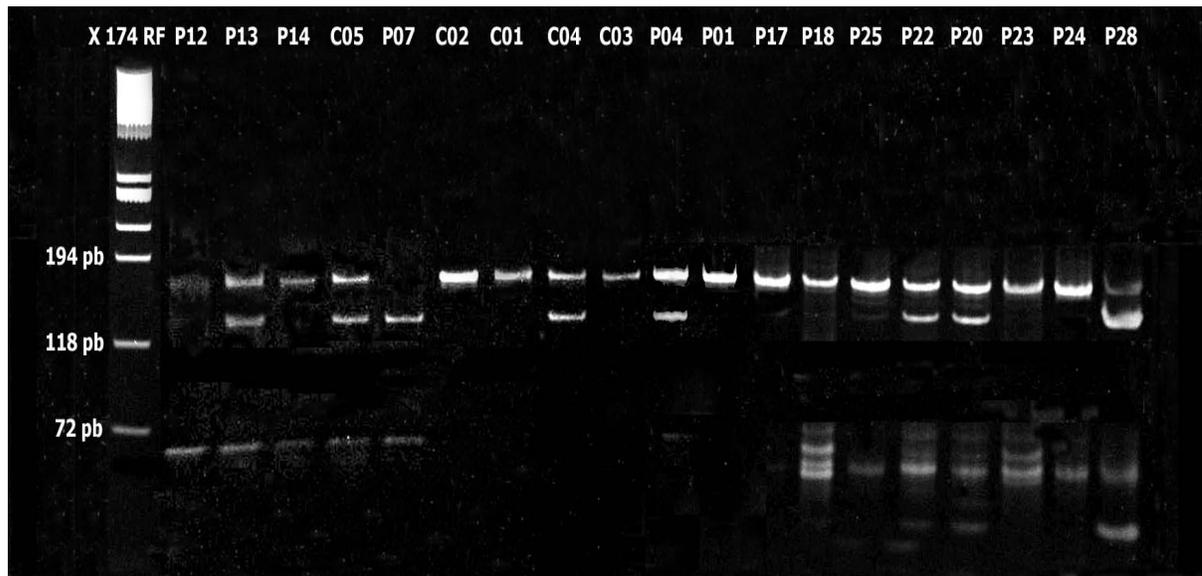
**Figura 2.** Produtos da reação em cadeia da polimerase (PCR) do éxon 23 do gene *xpd* 751 (161 pb) dos indivíduos expostos (P) e controles (C).

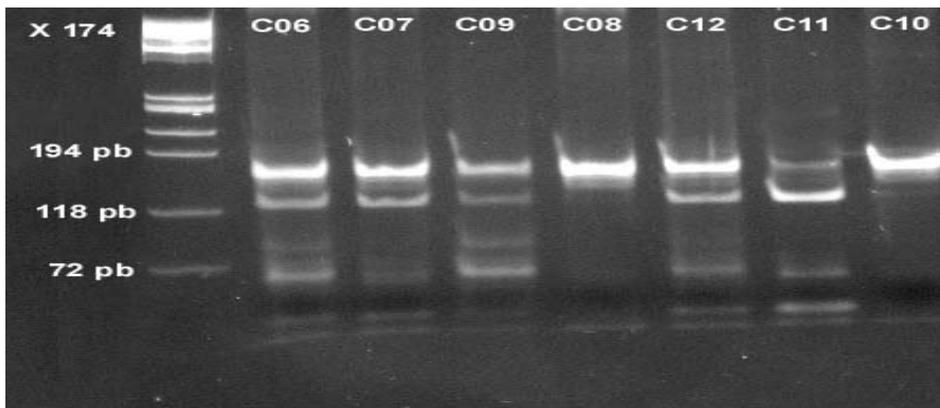
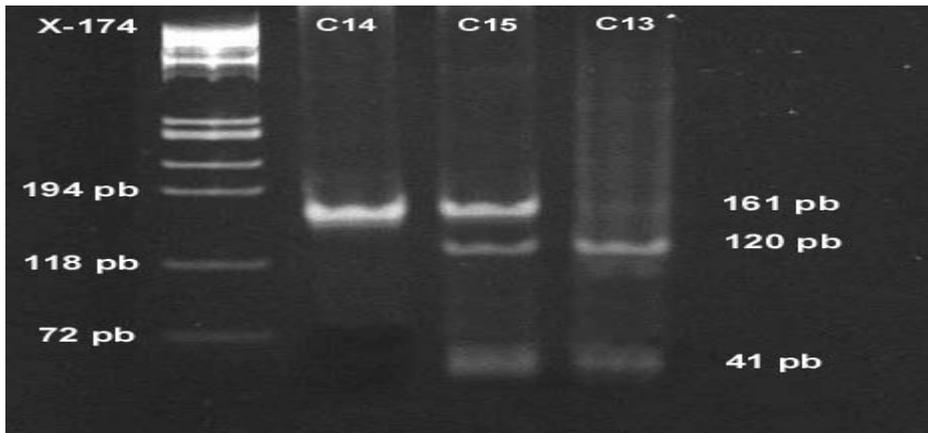
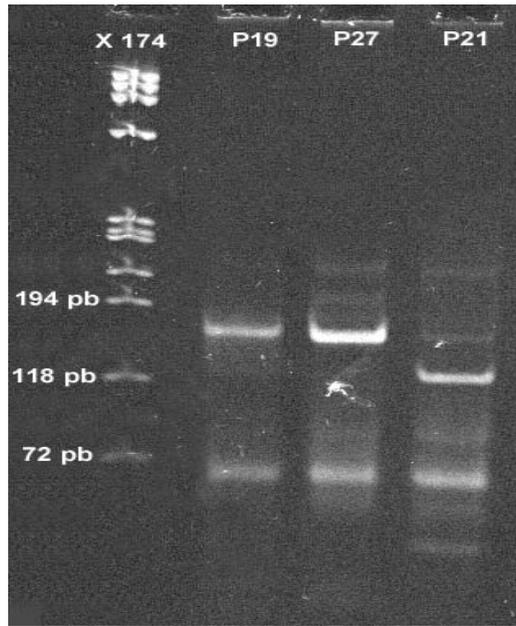
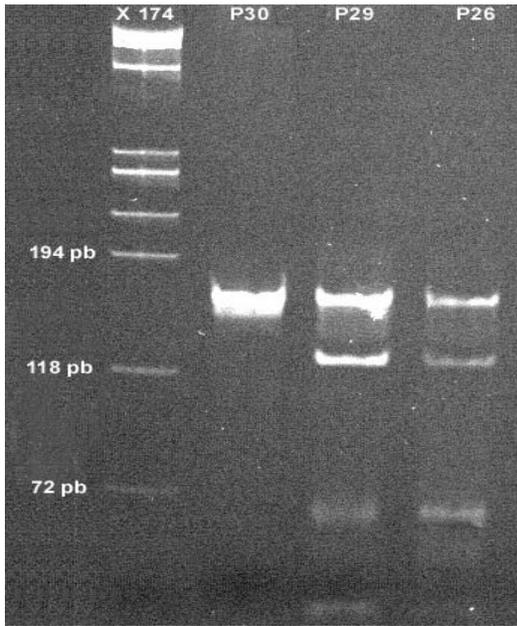




Com as amostras amplificadas, foi possível realizar a restrição do fragmento do gene *xpd* 751 clivado com a enzima *Pst* I (Figura 3) e posterior genotipagem dos indivíduos analisados.

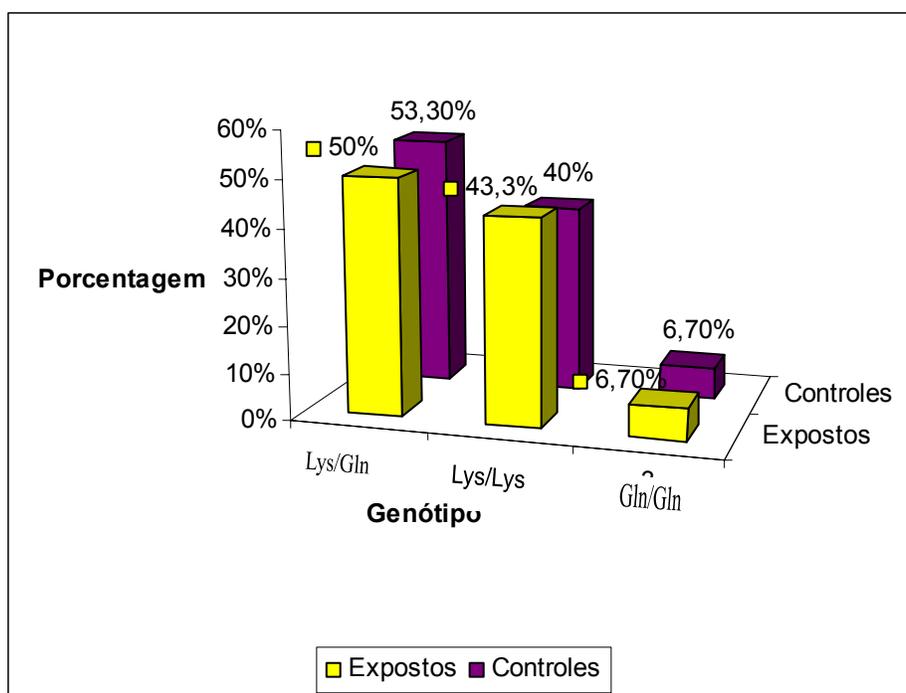
**Figura 3.** Eletroforese em gel de poliacrilamida 6% dos produtos da restrição do éxon 23 do gene *xpd* ( $Lys^{751}Gln$ ) dos indivíduos expostos e controles. Marcador de peso molecular: ØX174 digest Hae III.





O genótipo selvagem (Lys/Lys) foi encontrado em 43,3% dos indivíduos expostos e em 40,0% dos controles, o genótipo heterozigoto para a mutação (Lys/Gln) foi encontrado em 50,0% dos indivíduos expostos e em 53,3% dos controles e o genótipo homozigoto para mutação (Gln/Gln) foi encontrado em 6,7% dos indivíduos expostos e em 6,7% dos controles, sendo assim o menos freqüente (Gráfico 1).

**Gráfico 1** – Frequências dos genótipos encontrados nos grupos expostos e controles.



## DISCUSSÃO

A utilização de pesticidas para controlar as pragas da lavoura é um fato inegável, porém os cuidados com o seu manuseio continuam sendo negligenciados pelos aplicadores e pelo público que regulamenta o seu uso. Vários relatos apontam para má utilização desses produtos pelo homem (Paumgarten et al., 1998). A genotipagem de indivíduos expostos pode indicar a frequência dos genótipos mais susceptíveis ao aparecimento de câncer.

Com a genotipagem do gene *xpd* (Lys<sup>751</sup>Gln), foi possível verificar que de 30 pacientes expostos, 15 são heterozigotos para esta mutação (Lys/Gln) e dos 15 controles, oito deles também apresentaram este genótipo (Lys/Gln). Este polimorfismo tem sido associados ao câncer de pulmão (DUEL E.J. et al., 2000; PALLI D. et al., 2001; SPITZ M.R. et al., 2001; HOU S.M. et al., 2002; QIAO Y. et al., 2002; TANG D. et al., 2002; MATULLO G. et al., 2003) e Zhou et al. (2003) relataram também uma associação entre o uso crônico de cigarro com câncer de pulmão. Dentre os pacientes que apresentaram esta mutação cinco relataram fazer ou já ter feito uso de cigarro. Brewster et al. (2004), afirmaram que pelo menos uma cópia do alelo Gln do *xpd* aumenta o risco de desenvolvimento de cânceres secundários como o de próstata, pulmão e mama. Tomescu et al. (2001) relataram que o polimorfismo Lys<sup>751</sup>Gln do *xpd*, detectado em um grupo de indivíduos com melanoma reduz a capacidade de reparo do DNA, e concluíram que tal polimorfismo pode ser a causa do melanoma. Já Yeh et al. (2005) associaram este polimorfismo com o risco de câncer colo-retal. Este polimorfismo foi o mais frequente na população estudada, tanto no grupo exposto, como no grupo controle, o que coincide com o estudo de Dufloth et al. (2005), onde foi encontrado uma alta frequência deste genótipo em uma amostra da população da cidade de Campinas.

Dos indivíduos expostos analisados, dois são homozigotos para a mutação (Gln/Gln) e dos controles um indivíduo apresenta esta mutação. Dos expostos com esta mutação, um é exposto a pesticidas há 40 anos e o outro há apenas quatro, sugerindo um risco maior ao desenvolvimento de câncer. Yu et al. (2004) concluíram que o genótipo Gln/Gln do *xpd* pode ser um fator contribuinte para o risco de carcinoma de células escamosas do esôfago e este risco pode ser aumentado com a exposição ambiental.

Os demais apresentam o alelo homozigoto tipo selvagem (Lys/Lys), não apresentando portanto, a mutação neste fragmento de gene.

Os resultados desse trabalho podem ser complementados com o aumento no número de amostras, a introdução de um grupo com câncer, com a análise de outros genes de reparo como *xrcc3* e *xpd* e também com a realização da citogenética para análise da instabilidade cromossômica.

## CONCLUSÕES

A partir das análises foi possível concluir que o genótipo Lys/Gln foi o mais freqüente na população estudada, uma vez que apresentou alta incidência tanto no grupo exposto como no grupo controle.

A correlação da exposição a pesticidas com o aparecimento do genótipo mutado (Lys/Gln e Gln/Gln) não pode ser estatisticamente estabelecida ( $X^2 = 0,048$ ;  $p = 0,9762$ ), o que sugere a necessidade de outros estudos que envolvam a análise da instabilidade cromossômica para dar suporte aos resultados encontrados. Entretanto, fica evidente a importância do monitoramento molecular de populações expostas a mutagênicos.

## REFERÊNCIAS

BOLOGNESI, C. **Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies.** *Mutat Res*, v. 543, n. 3, p. 251-272, Jun. 2003.

BREWSTER, A. H. et al. **XPD polymorphism and risk of subsequent câncer in individuals with nomelanoma skin câncer.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, v. 13, n. 8, p. 1271-1275, Aug. 2004.

BROUGHTON, B. C. et al. **Five polymorphisms in the coding sequence of the xeroderma pigmentosum grup D gene.** *Mutat Res*, v. 362, p. 209-211, 1996.

CANALLE, R. et al. **Polymorphisms in the thymidylate synthase promoter and the DNA repair genes XRCC1 and XPD in a Brazilian population.** *Environ Mol Mutagen*, v. 9, p. 725-732, Dec. 2006.

COSTA, R. et.al. **Transcriptional profiles of unirradiated or UV-irradiated human cells expressing either the cancer-prone XPB/CS allele or the noncancer-prone XPB/TTD allele.** *Gustave Roussy Institute*, Fev 2005.

DUELL, E. J. et al. **Polymorphisms in the DNA repair genes XRCC1 and ERCC2 and biomarkers of DNA damage in human blood mononuclear cells.** *Carcinogenesis*, v. 21, p. 965-971, 2000.

DUFLOTH, R.M. et al. **DNA repair gene polymorphisms and susceptibility to familial breast cancer in a group of patients from Campinas, Brazil.** *Genetics and Molecular Resesearch*, v.4, Dec, 2005.

FRIEDBERG, E.C. **The discovery that xeroderma pigmentosum (XP) results from defective nucleotide excision repair.** *DNA repair*, 2004.

GOODE, E. L.; Ulrich, C. M.; POTTER, J. D. **Polymorphisms in DNA Repair Genes and Associations With Cancer Risk.** *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, v. 11, p. 1513-1530, Dec 2002.

HOU, S. M. et al. **The XPD variant alleles are associated with increased aromatic DNA adduct level and lung cancer risk.** *Carcinogenesis*, v. 23, p. 599-603, 2002.

HSU, T. C. **Genetic predisposition to cancer with special refernce to mutagen sensitivity. In vitro.** v. 23, p. 591-603, 1987.

KUSHIK, J.; DHARMANI, C. **Epidemiology of Pesticide Exposure and Cancer: a Review.** *Environ Health*, v. 20, n. 1, p. 15-38, 2005.

MATULLO, G. et al. **XRCC1, XRCC3, XPD gene polymorphisms, smoking and (32)P-DNA adducts in a sample of healthy subjects.** *Carcinogenesis*, v. 22, p. 1437-1445, 2003.

MOHRENWEISER, H. W. et al. **Identification of 127 amino acid substitution variants in screening 37 DNA repair genes in healthy humans.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, v. 11, p. 1054-1064, 2002.

MOORHEAD, P. S. et al. **Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral bllood.** *Cell*, v. 20, p. 613-616, 1960.

PALLI, D. et al. **DNA adduct levels and DNA repair polymorphisms in traffic-exposed workers and a general population sample.** *In J Cancer*, v. 94, p. 121-127, 2001.

PAUMGARTTEN, F. R. et al. **Levels of organochlorine pesticides in the blood serum of agricultural workers from Rio de Janeiro state, Brazil.** *Caderno de Saúde Pública*, v. 14, n. 3, p. 33-39, 1998.

QIAO, Y. et al. **Rapid assessment of repair of ultraviolet DNA damage with a modified host-cell reactivation assay using a luciferase reporter gene and correlation with polymorphisms of DNA repair genes in normal human lymphocytes.** *Mutat Res*, v. 509, p. 165-174, 2002.

RYBICKI, B. A. et al. **DNA Repair Gene XRCC1 and XPD Polymorphisms and Risk of Prostate Cancer.** *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, v. 13, p. 23-29, Jan. 2004.

SCHAEFFER, E.C. et al. **The ERCC2/DNA repair protein is associated with the class II BTF2/TFIIH transcription factor.** *EMBO J*, May 1994.

SHEN, M. R. et al. **Nonconservative aminoacid substitution variants exist at polymorphic frequency in DNA repair genes on healthy humans.** *Cancer Res*, v. 58, p. 604-608, 1998.

SIEGEL, S. **Nonparametric statistics for the behavioral science.** *Mc Graw –Hill*, p.305, 1956.

SPITZ, M. R. et al. **Modulation of nucleotide excision repair capacity by XPD polymorphisms in lung cancer patients.** *Cancer Res*, v. 61, p. 1354-1357, 2001.

TANG, D. et al. **Polymorphisms in the DNA repair enzyme XPD are associated with increased levels of PAH-DNA adducts in a case-control study of breast cancer.** *Breast Cancer Res Treat*, v. 75, p. 159-166, 2002.

TOMESCU, T. et al. **Nucleotide excision repair gene XPD polymorphisms and genetic predisposition to melanoma.** *Carcinogenesis*, v. 22, n. 3, p. 403-408, 2001.

XING, D. et al. **Polymorphisms of DNA repair genes XRCC1 and XPD and their associations with risk of esophageal squamous cell carcinoma in a Chinese population.** *Int J Cancer*, v. 100, n. 5, p. 600-605, Aug. 2002.

YANG, P. et al. **Polymorphisms in GLTSCR1 and ERCC2 are associated with the development of oligodendrogliomas.** *Cancer*, v. 103, n. 11, p. 2363-2372, Jun. 2005.

YEH, C. C. et al. **Polymorphisms of the XRCC1, XRCC3, & XPD genes, and colorectal cancer risk: a case-control study in Taiwan.** *BMC Cancer*, v. 5, n. 12, Jan. 2005.

YU, H. P. et al. **Polymorphisms in the DNA repair gene XPD and susceptibility to esophageal squamous cell carcinoma.** *Cancer Genet Cytogenet*, v. 154, n. 1, p. 10-15, Oct. 2004.

ZAR, J. H. **Bioestatistical Analysis**. Englewood Cliffs. *Prentice Hall International Editions*, p.718, 1984.

ZHOU, W. et al. **Polymorphisms in the DNA repair genes XRCC1 and ERCC2, smoking, and lung cancer risk**. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, v. 12, n. 4, p. 359-65, Apr. 2003.

## BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

AU, W. W.; SALAMA, S. A. A.; TORRES, C. H. **Functional Characterization of Polymorphisms in DNA Repair Genes Using Cytogenetic Challenge Assays.** *Environmental Health Perspectives*, v. 111, n. 15, p. 1843-1850, Nov. 2003.

AKA, P. et al. **Are genetic polymorphisms in OGG1, XRCC1 and XRCC3 genes predictive for the DNA strand break repair phenotype and genotoxicity in workers exposed to low dose ionising radiations?** *Mutat Res*, v. 556, n. 1-2, p. 169-181, Nov. 2004.

BENHAMOU, S.; SARASIN, A. **ERCC2/XPD Gene polymorphisms and cancer risk.** *Mutagenesis*, v. 17, n. 6, p. 463-469, Nov. 2002.

BENHAMOU, S.; SARASIN, A. **ERCC2/XPD Gene Polymorphisms and Lung Câncer: A Huge Review.** *American Journal of Epidemiology*, v. 161, n. 1, p. 1-14, Jan. 2005.

BERWICK, M.; VINEIS, P. **Markers of DNA Repair and Susceptibility to Cancer in Humans: an Epidemiologic Review.** *Journal of the National Cancer Institute*, v. 92, n. 18, p. 1537, Sep. 2000.

BIENSTOCH, R. J. et al. **Structural and functional characterization of the human DNA repair helicase XPD by comparative molecular modeling and site-directed mutagenesis of the bacterial repair protein UvrB.** *J Biol Chem*, v. 279, n. 7, p. 5306-5316, Feb. 2003.

BUCH, S. et al. **Association of polymorphisms in the cyclin D1 and XPD genes and susceptibility to cancers of the upper aero-digestive tract.** *Mol Carcinog*, v. 42, n. 4, p. 222-228, 2005.

GARCIA, A. M. **Pesticide Exposure and Women's Health.** *American Journal of Industrial Medicine*, v. 44, p. 584-594, 2003.

JAGA, K.; DHARMANI, C. **Epidemiology of Pesticide Exposure and Cancer: a Review.** *Reviews on Environmental Health*, v. 1, p. 15-38, 2005.

KOIFMAN, S.; KOIFMAN, R. J. **Environment and cancer in Brazil: an overview from a public health perspective.** *Mutation Research*, v. 544, p. 305-311, 2003.

KOJYA, S. et al. **Familial nasal NK/T-cell lymphoma and pesticide use.** *Am J Hematol*, v. 66, n. 2, p. 145-147, Fev. 2001.

MILLS, P. K.; ZAHM, S. H. **Organophosphate pesticide residues in urine of farmworkers and their children in Fresno County, California.** *Am J Ind Med*, v. 40, n. 5, p. 570-577, Nov. 2001.

QU, T. et al. **Micronuclei in EM9 cells expressing polymorphic forms of human XRCC1.** *Cancer Lett*, v. 221, n. 1, p. 91-95, Apr. 2005.

ROOS, A. J. D. et al. **Integrative assessment of multiple pesticides as risk factors for non-Hodgkin's lymphoma among men.** *Occup Environ Med*, v. 60, p. 1-9, 2003.

ROULLAND, S. et al. **Characterization of the t(14;18) BCL2-IGH Translocation in Farmers Occupationally Exposed to Pesticides.** *Cancer Research*, v. 64, p. 2264-2269, Mar. 2004.

SALES, M. M.; LUCCA, E. J. **Suscetibilidade Genética à Bleomicina: Estudo em Quatro Famílias de pares de Gêmeos Suscetíveis.** *Salusvita*, v. 15, n. 1, p. 163-174, 1996.

SHI, Q. et al. **Reduced DNA repair of benzo[a]pyrene diol epoxide-induced adducts and common XPD polymorphisms in breast cancer patients.** *Carcinogenesis*, v. 25, n. 9, p. 1695-1700, Sep. 2004.

VIDAIR, C. A. **Age dependence of organophosphate and carbamate neurotoxicity in the postnatal rat: extrapolation to the human.** *Toxicol Appl Pharmacol*, v. 196, n. 2, p. 287-302, Apr. 2004.

# APÊNDICE

## APÊNDICE A – QUESTIONÁRIO

### Questionário

#### Pesquisa: Detecção de alterações Genéticas por Biologia Molecular

#### 1 Informações pessoais:

- 1.1 Nome do participante:.....
- 1.2 R.G: .....
- 1.3 Profissão:.....
- 1.4 Data de Nascimento:.....
- 1.5 Sexo: ( ) feminino ( ) masculino
- 1.6 Cor:.....
- 1.7 Estado Civil: ( ) solteiro ( ) casado ( ) divorciado ( ) outros: .....
- 1.8 Quantos Filhos:.....
- 1.9 Número da Doação: .....

#### 2 Dados sobre campo de Trabalho

- 2.1 Há quanto tempo trabalha na lavoura?  
.....
- 2.2 Plantação:  
.....
- 2.3 Utiliza algum tipo de pesticida na lavoura?  
( ) sim ( ) não
- 2.4 Há quanto tempo você aplica o pesticida na lavoura?  
.....
- 2.5 Como você aplica o pesticida na lavoura?  
.....
- 2.6 Quais os pesticidas você utiliza na lavoura?  
.....

#### 3 Dados Complementares

- 3.1 Você é Fumante?  
( ) sim ( ) não
- 3.2 Há quanto tempo?.....

3.3 Quantos cigarros fuma por dia?.....

3.4 Fuma cigarro de palha?

sim       não

Quantos por dia?.....

3.5 Você bebe?

sim       não

3.6 Com que frequência? .....

3.7 Há quanto tempo?.....

#### **4 Histórico Familiar**

4.1 Tem Histórico de câncer na família?

sim       não

4.2 Qual o parentesco?.....

4.3 Qual tipo de câncer?.....

4.4 Outras Doenças: .....

#### **5 Outras Informações**

5.1 Café (copos/dia): .....

5.2 Carne vermelha (vezes/semana):.....

5.3 Carne branca (vezes/semana):.....

5.4 Frutas e verduras (vezes/semana):.....

5.5 Ingeriu algum medicamento no dia ou semana da coleta?

Sim      Qual:.....

Não

## APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO

Eu, \_\_\_\_\_, tendo sido satisfatoriamente informado sobre a colaboração nas pesquisas: **“Estudo de associação entre aberrações cromossômicas e polimorfismos gênicos no gene de reparo XPD em indivíduos expostos a pesticidas”** e **“Estudo de associação entre aberrações cromossômicas e polimorfismos gênicos no gene de reparo XRCC1 em indivíduos expostos a pesticidas”**, realizadas sob responsabilidade da Profa Dra. Magaly Machado Sales, pesquisadora do Laboratório de Biologia Molecular da Universidade do Sagrado Coração – USC, localizada na rua Irmã Arminda 10-50, bairro Jardim Brasil- Bauru , com telefone (14)32357000, concordo em colaborar doando \_\_\_ ml de sangue periférico para extração de DNA e cultura de células para análise, onde não estarei sujeito a riscos e encargos. Informo também não ter sido pressionado ou obrigado a participar e que estou livre para recusar minha participação neste estudo ou para desistir a qualquer momento. Minha decisão não afetará adversamente meu tratamento na clínica ou causar perda de benefícios para os quais eu poderei ser indicado.

Estou também ciente que as responsáveis por este trabalho estarão disponíveis para responder a quaisquer perguntas ou dúvidas de minha parte. Entendo que qualquer informação obtida sobre mim, será confidencial. Eu também entendo que meus registros de pesquisa estão disponíveis para revisão dos pesquisadores e que minha identidade não será revelada em nenhuma publicação dessa pesquisa. Eu certifico que li ou foi-me lido o texto de consentimento e entendi seu conteúdo. Uma cópia deste formulário ser-me-á fornecida. Minha assinatura demonstra que concordei livremente em participar deste estudo. Por conseguinte, consinto na publicação para propósitos científicos.

Assinatura do participante da pesquisa:

.....

Data:.....

Eu certifico que expliquei a(o) Sr.(a)

....., acima, a natureza, propósito, benefícios e possíveis riscos associados à sua participação nesta pesquisa, que respondi todas as questões que me foram feitas e testemunhei assinatura acima.

Assinatura do Pesquisador Responsável:.....

Data:.....

Aluna de Iniciação:.....

Responsável pela coleta:.....