

UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO

**DANIELE FERNANDES DA SILVA
JUSCIELE BROGIN MORELI**

**ESTUDO DE POLIMORFISMOS NOS GENES DE REPARO
xrcc1 E *xpd* EM INDIVÍDUOS EXPOSTOS A PESTICIDAS**

**BAURU
2007**

UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO

**DANIELE FERNANDES DA SILVA
JUSCIELE BROGIN MORELI**

**ESTUDO DE POLIMORFISMOS NOS GENES DE REPARO
xrcc1 E *xpd* EM INDIVÍDUOS EXPOSTOS A PESTICIDAS**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Centro de Ciências
da Saúde, para obtenção do título de
Farmacêutico, sob orientação da
Profa. Dra. Magaly Machado Sales.

**BAURU
2007**

S5861e

Silva, Daniele Fernandes da.

Estudo de polimorfismos nos genes de reparo *xrcc1* e *xpd* em indivíduos expostos a pesticidas. / Daniele Fernandes da Silva e Jusciele Brogin Moreli . -- 2007. 53 f.

Orientadora: Prof^ª. Dra Magaly Machado Sales
Trabalho de Conclusão de Curso (Farmácia) -

Universidade do Sagrado Coração - Bauru - SP.

1. Pesticidas 2. Câncer 3. Genes de reparo
I. Sales, Magaly Machado II. Moreli, Jusciele Brogin
III. Título.

**DANIELE FERNANDES DA SILVA
JUSCIELE BROGIN MORELI**

**ESTUDO DE POLIMORFISMOS NOS GENES DE REPARO
xrcc1 E *xpd* EM INDIVÍDUOS EXPOSTOS A PESTICIDAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde, para obtenção do título de Farmacêutico, sob orientação da Profa. Dra. Magaly Machado Sales.

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Magaly Machado Sales _____

Profa. Dra. Maricê Thereza Domingues Heubel _____

Prof. Dr. Paulo Henrique Weckwerth _____

Bauru, de de 2007.

Dedicatória Daniele:

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 Moreli, pelo carinho, companhia e amizade sincera e à Juliana M. Puzzi, maravilhosa pessoa que esteve presente em momentos tão especiais.

Dedico também às minhas tatas queridas, Júlia Fiori, Andreza Fredi e Tatiana Casanova, pela paciência, e anos de amizade incomparável e insubstituível. Ao meu namorado, pela enorme paciência e atenção. 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.

Dedicatória Jusciele

Dedico este trabalho à Deus, à Nossa Senhora e à minha linda família que não apenas nesse projeto, mas em todas as minhas conquistas sempre estão presentes.

À minha orientadora Profa. Dra. Magaly Machado Sales pela grande oportunidade, apoio e paciência.

À minha companheira Daniele Fernandes (CIR) que sempre esteve do meu lado nesse projeto e em grande parte da minha vida. Sua amizade é inesquecível.

Ao super, mega técnico Wilson Orcini que sempre tem soluções simples e rápidas para problemas tão grandes.

À Juliana Puzzi que durante esses anos de faculdade se tornou uma irmã e nunca mais quero me separar dessa linda pessoa. À Vanessa Arone companheira de república e todos que fizeram parte da minha vida durante a faculdade.

Agradecimentos Daniele

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

Agradecimentos Jusiele

Agradeço a todas as pessoas que participaram para finalização desse trabalho, principalmente aos doadores de amostras, colaboradores do hemocentro de Botucatu, companheiros de laboratório, funcionários, amigos e professores da Universidade do Sagrado Coração.

RESUMO

Os pesticidas constituem uma categoria heterogênea de substâncias químicas especificamente designadas para o controle de pragas e doenças nos vegetais. A maioria das pessoas são inevitavelmente expostas aos pesticidas através da contaminação ambiental, principalmente aqueles expostos em seu ambiente de trabalho. 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. O gene *xrcc1* codifica uma das principais proteínas de reparo de DNA, envolvidas no reparo de excisão de bases e o gene *xpd* codifica uma proteína envolvida no reparo por excisão de nucleotídeos, uma das melhores formas de reparar lesões no DNA induzidas pelo cigarro, UV e produtos químicos. Resultados de estudos epidemiológicos sugerem que polimorfismos em genes de reparo podem influenciar na suscetibilidade de alguns tipos de cânceres. Foi analisado os polimorfismos Arg³⁹⁹Gln no gene de reparo *xrcc1* e Lys⁷⁵¹Gln no gene de reparo *xpd* em 30 indivíduos expostos a pesticidas e 15 controles (selecionados pela idade, sexo e não exposição direta aos pesticidas) pela técnica da PCR-RFLP. A frequência dos genótipos Arg/Gln para *xrcc1* e Lys/Gln para *xpd*, foi elevada em ambos os grupos estudados. O teste estatístico de qui-quadrado indica que a distribuição dos genótipos parece não diferir entre os grupos estudados ($\chi^2=2,31$ e $p= 0,3154$ para *xrcc1* e $\chi^2 = 0,048$; $p = 0,9762$ para *xpd*). Porém, a frequência dos genótipos suscetíveis foi elevada nos grupos expostos e controles, determinando a necessidade de uma análise de instabilidade cromossômica e uma orientação esclarecida aos trabalhadores expostos a pesticidas.

Palavras-chave: Pesticidas, Câncer, genes de reparo.

ABSTRACT

Pesticides constitute a heterogeneous chemical substance category specifically assigned for the control of plagues and illnesses in vegetables. The majority of people is inevitably exposed to pesticides through environmental contamination, specially agricultural workers. Cancer is an illness that can be attributed to multiple factors, including genetic constitution, environment and life style. Exposure to pesticides is an important environmental factor, due to its association with disease development. The gene *xrcc1* codes for one of the main proteins of DNA repair mechanisms, the base excision repair, and the gene *xpd* codes for a protein involved in nucleotide excision repair which removes damage to the DNA caused by cigarette smoking, UV and chemical substances. Results of epidemiological studies suggest that polymorphism in DNA repair genes can increase susceptibility to some types of cancers. In this work we analyzed the Arg³⁹⁹Gln polymorphism in *xrcc1* and Lys⁷⁵¹Gln polymorphism in *xpd* in 30 individuals exposed to pesticides and 15 controls (selected by age, sex and unexposed to pesticides) through PCR-RFLP. The frequencies of the Arg/Gln genotype for *xrcc1* and Lys/Gln for *xpd* were high in both studied groups. Qui-square statistical analysis indicated that genotype distribution did not differ between the studied groups ($\chi^2=2,31$ and $p = 0,3154$ for *xrcc1* and $\chi^2=0,048$; $p=0,9762$ for *xpd*). We conclude that the high frequency of susceptible genotypes in both groups determines the necessity of chromosomal instability analysis and enforcement of safety rules and utilization of safety equipment by agricultural workers in direct contact with pesticides.

Key-words: Pesticides, Cancer, Repair genes.

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 μ l.
RFLP	Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição.
RPM	Rotação por minuto.
SDS	Detergente iônico dodecil sulfato de sódio.
TEMED	N,N,N',N'-Tetra metil etileno diamino.
TEB	Tampão tris EDTA borato.
TKM1	Solução de hemólise composta por Tris HCl, KCl e MgCl ₂ .
TKM2	Solução para lise de leucócitos composta por Tris HCl, KCl, MgCl ₂ e EDTA.
UV	Ultra violeta

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	09
POLIMORFISMO NO GENE <i>xrcc1</i> E <i>xpd</i> E A SUSCETIBILIDADE AO CÂNCER.....	12
MATERIAL E MÉTODOS.....	16
RESULTADOS.....	24
DISCUSSÕES.....	40
CONCLUSÕES.....	43
REFERÊNCIAS.....	44
BIBLIOGRAFIA CONSULTADA.....	48
APÊNDICES	50

INTRODUÇÃO

Os pesticidas constituem uma categoria heterogênea de substâncias químicas especificamente designadas para o controle de pragas 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 mostrado 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; ALAVANJA et al., 2004). 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).

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).

Os genes *xrcc1*, *xrcc3* e *xpd* são os principais genes responsáveis pelos mecanismos de reparo do DNA (SEEDHOUSE et al., 2002).

O gene *xrcc1*, localizado no cromossomo 19 q13.2, codifica uma das principais proteínas de reparo de DNA envolvidas no reparo de excisão de bases (BER). Sua transcrição é iniciada quando ocorre exposição à radiação ionizante e agentes alquilantes, ocorrendo um

reparo eficiente de quebra de fita única do DNA. Esta proteína interage com DNA ligase III, beta polimerase e poli polimerase (ADP – ribose) para participar do reparo de excisão de base. Polimorfismos neste gene podem levar a uma diminuição da capacidade de reparo do DNA, e assim à predisposição hereditária ao aparecimento de câncer (HU et al., 2005).

As células estão constantemente expostas aos possíveis danos causados por espécies reativas de oxigênio (ROS- “Reactive oxygen species”). Esses ROS podem ser originados de fontes exógenas e endógenas. A luz ultravioleta (UVA e UVB), irradiação ionizante e agentes químicos são fontes exógenas importantes para a formação de ROS. Já os ROS formados dentro das células podem ser originados do próprio metabolismo celular. Esses ROS podem ocasionar danos na molécula de DNA provocando uma perda de integridade do genoma. Para reparar esse dano, a célula conta com um mecanismo de reparo chamado mecanismo de reparo por excisão de bases (BER) (BERRA; MENCK, 2006). Em humanos, este sistema de reparo reconhece diferentes tipos de danos e ativa mecanismos específicos para repará-los e manter a estabilidade genômica (MIN et al., 2007).

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 et al., 2005). 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 produtos 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 da 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, 2004).

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. Estudos que relacionam danos em genes de reparo de DNA e câncer têm apresentado resultados não significativos para alguns genes (TAE et al., 2004; LEE et al., 2002; DELIGEZER; DALAY, 2004; HU et al., 2005; LOPEZ et al., 2007; DELIGEZER; AKISIK; DALAY, 2007). Entretanto, a análise de múltiplos genes pode ajudar a esclarecer a associação do câncer com tais polimorfismos e capacidade de reparo do DNA (GOODE et al., 2002).

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 frequências dos genótipos dos genes *xrcc1* (Arg³⁹⁹Gln) e *xpd* (Lys⁷⁵¹Gln) 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 (Polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição) e a significância das frequências encontradas foi feita utilizando o teste do qui-quadrado.

POLIMORFISMO NOS GENES DE REPARO *xrcc1* e *xpd* E A SUSCETIBILIDADE AO CÂNCER

Resultados de vários estudos epidemiológicos sugerem que o polimorfismo Arg³⁹⁹Gln do gene *xrcc1* pode influenciar na suscetibilidade de vários tipos de cânceres (KELSEY et al., 2004).

Duarte et al. (2005) estudaram a freqüências dos polimorfismos dos genes *xrcc1* e *xrcc3* em um grupo de 300 indivíduos do sudeste do Brasil (com descendência européia e africana) comparando com outras populações. Os resultados demonstraram que a freqüência dos genótipos do polimorfismo Arg³⁹⁹Gln do gene *xrcc1* na população do sudeste brasileiro com descendência européia foi de 43% para Arg/Arg, 40% para Arg/Gln e 17% para Gln/Gln, e a freqüência entre os indivíduos brasileiros com descendência africana foi de 64% para Arg/Arg, 27% para Arg/Gln e 9% para Gln/Gln.

Seedhouse et al. (2002) encontraram uma diferença significativa na distribuição de genótipos do polimorfismo Arg³⁹⁹Gln no *xrcc1* entre grupo de pacientes em tratamento com leucemia mieloblástica aguda e o grupo controle. A presença do alelo Gln indicou um efeito protetor nos indivíduos do grupo controle comparado com pacientes em tratamento.

Tae et al. (2004) não encontraram associações significantes entre os polimorfismos do *xrcc1*: Arg¹⁹⁴Trp, Arg²⁸⁰His e Arg³⁹⁹Gln e o aparecimento de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço na população coreana e pacientes acometidos deste carcinoma. Estes mesmos polimorfismos também foram estudados por Lee et al. (2002), que não encontraram associação com o risco de câncer gástrico na população coreana. Kelsey et al. (2004) observaram uma redução do risco de desenvolvimento de câncer de bexiga entre indivíduos homozigotos para o polimorfismo Arg³⁹⁹Gln comparados com aqueles com um ou dois alelos selvagens (Arg/Arg) num estudo de caso-controle em uma amostra da população de New Hampshire.

Smith et al. (2003) encontraram uma fraca associação entre o alelo Trp e risco de câncer de mama, porém verificou-se uma possível interação gene-gene entre o alelo Trp do gene *xrcc1* e Met do gene *xrcc3*, associados com o risco deste carcinoma. Este mesmo carcinoma foi estudado por Deligezer e Dalay (2004) em um estudo envolvendo os polimorfismos Arg¹⁹⁴Trp e Arg³⁹⁹Gln do gene *xrcc1* e nenhuma associação foi encontrada.

Hu et al. (2005) estudaram uma possível interação entre os polimorfismos Arg¹⁹⁴Trp e Arg³⁹⁹Gln do gene *xrcc1*, câncer de pulmão e exposição ao tabaco e não encontraram

associações significantes entre os genótipos determinados com o aumento do risco deste câncer nos pacientes estudados.

Em um estudo envolvendo os polimorfismos Asp³¹²Asn e Lys⁷⁵¹Gln do gene *xpd* e o polimorfismo Arg³⁹⁹Gln do *xrcc1*, Benjamin et al. (2004) encontraram um aumento do risco de câncer de próstata quando os genótipos Asn/Asn e Gln/Gln dos genes *xpd* e *xrcc1* estavam presentes. Em um outro estudo envolvendo os genes *xpd* (Asp³¹²Asn e Lys⁷⁵¹Gln) e *xrcc1* (Arg³⁹⁹Gln), Zhou et al. (2003) concluíram que a associação entre eles é um importante fator para o aumento do risco de câncer de pulmão.

Polimorfismos em genes envolvidos no mecanismo de reparo por excisão de bases (BER) podem estar associados com câncer de pulmão, e uma associação significativa entre o polimorfismo Arg³⁹⁹Gln do gene *xrcc1* e o risco de câncer de pulmão tem sido encontrada nos estudos epidemiológicos moleculares (POPANDA et al., 2004; ZIENOLDDINY et al., 2006; VOGEL et al., 2004). Porém, outros estudos com o polimorfismo Arg³⁹⁹Gln, demonstraram que a frequência do genótipo Gln/Gln era maior no grupo controle quando comparado com o grupo de indivíduos com câncer de pulmão e assim concluíram que o genótipo Gln/Gln pode não estar contribuindo para o aumento do risco de desenvolvimento de câncer de pulmão (LOPEZ et al. 2007) .

O estudo de Deligezer, Akisik e Dalay (2007) demonstrou que não houve uma associação entre o polimorfismo Arg³⁹⁹Gln do gene *xrcc1* e a leucemia mieloide crônica, pois a distribuição dos genótipos Arg/Arg, Arg/Gln e Gln/Gln era semelhante entre o grupo controle e o grupo de indivíduos com leucemia mieloide crônica.

Xing et al. (2002) obtiveram resultados que sugeriram uma associação entre o aumento do risco de desenvolvimento de carcinoma de células escamosas do esôfago e polimorfismos no *xrcc1* em um estudo de uma amostra da população coreana envolvendo os genes *xrcc1* (Arg¹⁹⁴Trp e Arg³⁹⁹Gln) e *xpd* (Asp³¹²Asn e Lys⁷⁵¹Gln).

Shen et al. (2003) encontraram uma associação entre o gene *xrcc1* com câncer de bexiga, pois foi possível verificar que o alelo Gln deste gene tem um efeito protetor ao aparecimento do câncer de bexiga em fumantes.

Polimorfismos no gene *xpd* 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 et al., 1996; SHEN et al. 1998; MOHRENWEISER et al., 2002).

Dufloth et al. (2005) estudaram o polimorfismo Lys⁷⁵¹Gln do gene *xpd* 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* (Asp³¹²Asn, éxon 10 e Lys⁷⁵¹Gln, éxon 23) têm sido associados ao câncer de pulmão (DUEL et al., 2000; PALLI et al., 2001; SPITZ et al., 2001; HOU et al., 2002; QIAO et al., 2002; TANG et al., 2002; MATULLO et al., 2003).

Indivíduos com câncer de pele apresentaram 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 Lys⁷⁵¹Gln 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* (Arg³⁹⁹Gln), *xrcc3* (Thr²⁴¹Met) e *xpd* (Lys⁷⁵¹Gln) 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 *gltsr1* (éxon 1) e *xpd* (éxon 22) com o desenvolvimento de oligodendrogliomas e concluíram que somente o *gltsr1* 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 Asp³¹²Asn 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 et al. (2002) obtiveram resultados negativos no estudo de associação entre os polimorfismos Asp³¹²Asn e Lys⁷⁵¹Gln 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 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 funcionários da Universidade do Sagrado Coração (USC) escolhidos de acordo com a idade, dentro de uma variação de mais ou menos dois anos do grupo exposto.

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

Métodos

Lise de Glóbulos Vermelhos

Para separar o plasma, o sangue passou por uma centrifugação durante cinco minutos a 3.000 rpm. A seguir, foi desprezado 1ml do plasma e o restante da amostra foi 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, foi acrescentado 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 as amostras passaram por centrifugação durante 3 minutos a 4.000 rpm e o sobrenadante desprezado. Após esta etapa, foi acrescentado 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 foram armazenadas a -20° C.

Extração de DNA genômico

Ao “pellet” de glóbulos brancos foi adicionado 800 µl de TKM-2 e 50 µl de SDS 10% com homogeneização no agitador (Phoenix) por 3 segundos. As amostras foram incubadas a 55°C, em banho-maria, durante 1 hora com agitação (Phoenix) a cada 10 minutos. Em seguida, foi adicionado 360 µl 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 foi 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 µl do etanol do tubo de hemólise e centrifugado a 12.000 rpm por 3 minutos. O sobrenadante foi desprezado e após adicionou 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, foi adicionado 100 µl de água livre de DNases e RNases e as amostras foram incubadas no banho-maria a 55°C durante 10 minutos. Os “pellets” diluídos foram armazenados a -20°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 absorvância a 260nm. No final as amostras de DNA foram diluídas com água livre de DNases e RNases até uma concentração de 10ng/μl, para serem utilizadas nas reações de amplificação.

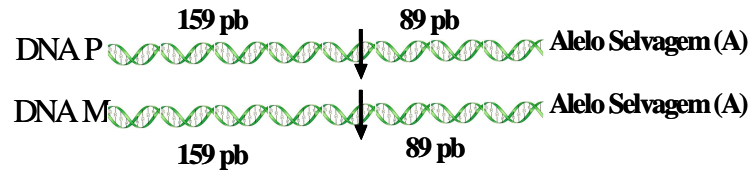
Genotipagem

Para a amplificação do gene *xrcc1* Arg³⁹⁹Gln, foram usados os “primers” de acordo com Au et al. (2005): *Foward* 5'- CAAGTACAGCCAGGTCCTAG -3' e *Reverse* 5'- CCTTCCCTCATCTGGAGTAC -3'. A desnaturação inicial foi realizada a 95°C por 2 minutos, seguida de 35 ciclos com desnaturação a 94°C por 15 segundos, anelamento à 57°C por 45 segundos, extensão à 72°C por 45 segundos e finalmente extensão final à 72°C por 5 min.

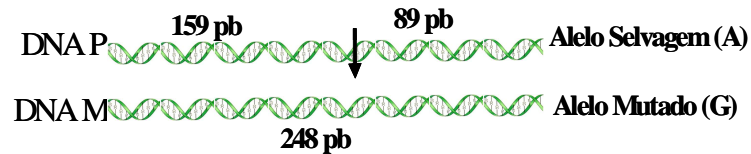
Para amplificar o éxon 23 do gene *xpd* (Lys⁷⁵¹Gln) foram sintetizados “primers” de acordo com Au et al. (2005): *foward* 5'- CTGCTCAGCCTGGAGCAGCTAGAATCAGAGGACGCTG- 3' e *reverse* 5'- AAGACCTTCTAGCACCACCG-3'. A ciclagem programada no termociclador teve uma desnaturação inicial de 95°C por 2 minutos, seguida de 40 ciclos de 94°C por 15 segundos, 67°C por 30 segundos e 72°C por 45 segundos, seguidos de uma extensão final de 72°C por 5 minutos.

Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (PCR-RFLP)

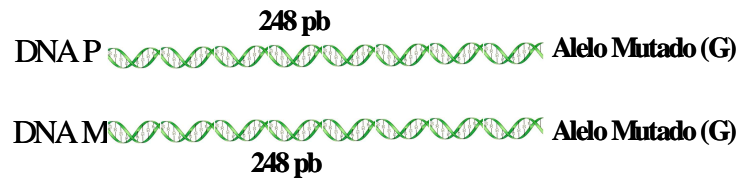
Após a PCR foi realizada a digestão enzimática dos fragmentos amplificados para genotipagem do polimorfismo do gene *xrcc1* (Arg³⁹⁹Gln), utilizando a enzima *Nci* I (Figura 1) e do gene *xpd* (Lys⁷⁵¹Gln), utilizando a enzima *Pst* I (Figura 2).



Duas bandas: 159 pb; 89 pb: indivíduo homocigoto sem mutação



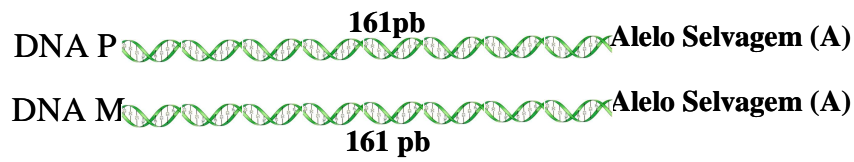
Três bandas: 248 pb; 159 pb; 89 pb: indivíduo heterocigoto para mutação



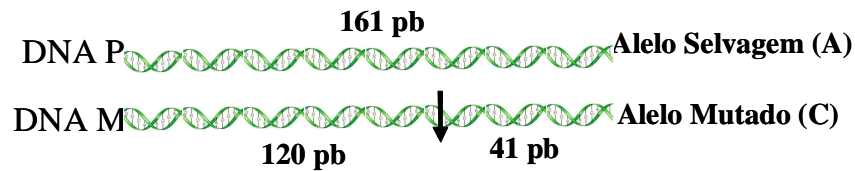
Uma banda: 248 pb: indivíduo homocigoto para mutação

↓ Ponto de corte da enzima de restrição *Nci* I. DNAs P ou M: paterno ou materno, respectivamente.

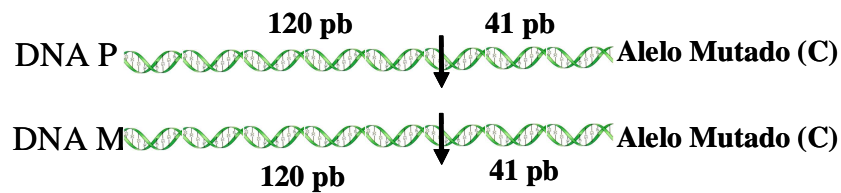
Figura 1- Genotipagem do *xrcc1* 399 (éxon 10): após restrição com a enzima *Nci* I, o fragmento é clivado conforme o sítio de reconhecimento na sequência de DNA.



Uma banda: 161 pb, indivíduo homocigoto sem mutação



Três bandas: 161 pb; 120 pb; 41 p: indivíduo heterocigoto para mutação



Duas bandas: 120 pb e 41 pb: indivíduo homocigoto para mutação

↓ Ponto de corte da enzima de restrição *Pst* I. DNAs P ou M: paterno ou materno, respectivamente.

Figura 2- Genotipagem do *xpd* 751 (exon 23): após restrição com a enzima *Pst* I, o fragmento é clivado conforme o sítio de reconhecimento na sequência de DNA.

Eletroforese

Os produtos do PCR foram submetidos à eletroforese em agarose 1% 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 realizada com o brometo de etídio a 5%. A visualização dos fragmentos no gel foi feita em um transiluminador UV, sendo as imagens dos géis fotografadas (foto documentador de géis Alpha Imager EC) e armazenadas.

Os produtos da restrição foram submetidos à 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 . O marcador de peso molecular utilizado foi o Øx174 Hae III digest. A corrida teve duração de 60 minutos a 70 volts e amperagem livre. A visualização dos fragmentos de restrição foi feita em gel corado com brometo de etídio sob luz ultravioleta, sendo as imagens fotografadas no fotodocumentador de géis (foto documentador de géis Alpha Imager EC) e armazenadas.

Análise estatística

Para verificar se existe uma diferença significativa entre os resultados obtidos dos indivíduos expostos e 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 *xrcc1* 399 e do gene *xpd* 751 e a restrição dos fragmentos amplificados dos indivíduos expostos e controles.

A Tabela 1 refere-se aos dados de 30 trabalhadores rurais expostos a pesticidas, oriundos da aplicação de questionários. Verificou-se que 16 trabalhadores aplicam pesticidas nas lavouras há mais de 10 anos e 14 trabalhadores há 10 anos ou menos.

TABELA 1 - Dados referentes ao tempo na lavoura, tempo de aplicação de pesticidas, hábito de fumar, ingestão de álcool e idade do grupo exposto do sexo masculino.

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

* (-) não faz o uso; (+) faz o uso.

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

TABELA 2 – Dados referentes ao tempo na lavoura, tempo de aplicação de pesticidas, hábito de fumar, ingestão de álcool e idade do grupo controle do sexo masculino

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

* (-) não faz o uso; (+) faz o uso

Com a verificação da qualidade do DNA em gel de agarose 1% (Figura 3), foi possível verificar que as amostras E01 a E16 (exceto a amostra E05) e a amostra C11 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 dos genes *xpd* 751 e *xrcc1* 399.

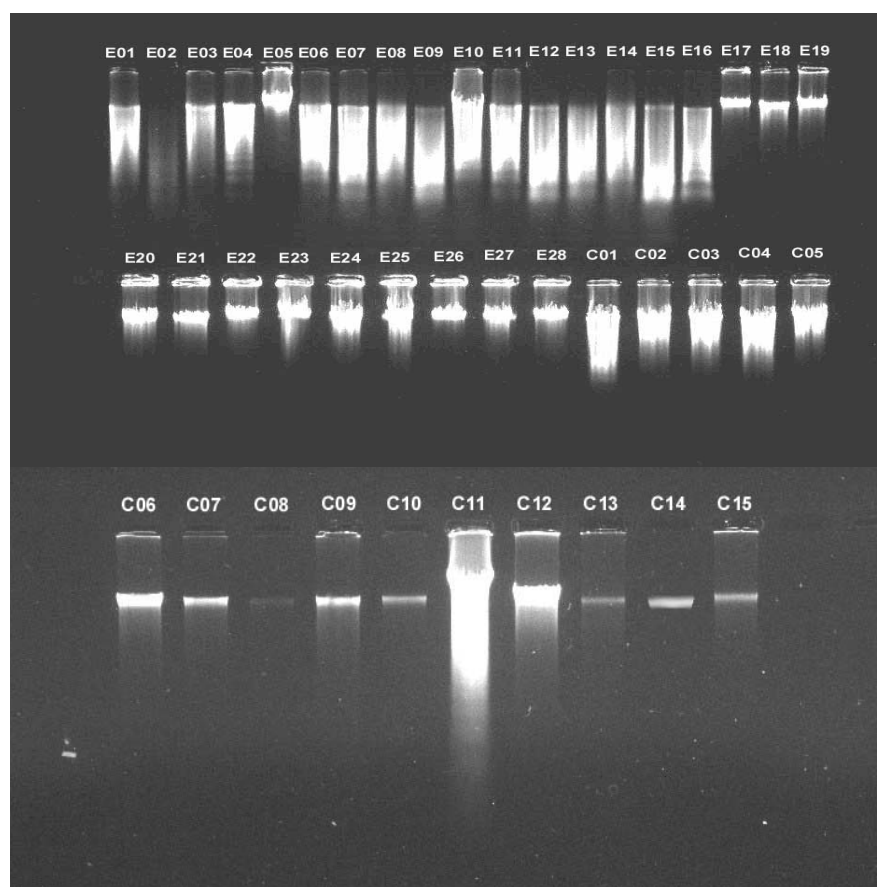


Figura 3- Eletroforese em gel de agarose 1% para verificação da qualidade do DNA extraído.

GENE *xrcc1*

Dos produtos da PCR (Figura 4), os que não amplificaram na primeira reação (E02, E04, E06, E08, E11, E18, E19, C12, C13 e C14) foram repetidos nas reações seguintes com aumento da concentração final de DNA, de acordo com a quantificação das amostras realizada no laboratório de Biologia Molecular da Divisão Hemocentro na Faculdade de Medicina da Unesp (Botucatu). Dessa forma foi possível obter a amplificação do fragmento do gene *xrcc1* (248pb) de todos os indivíduos estudados.

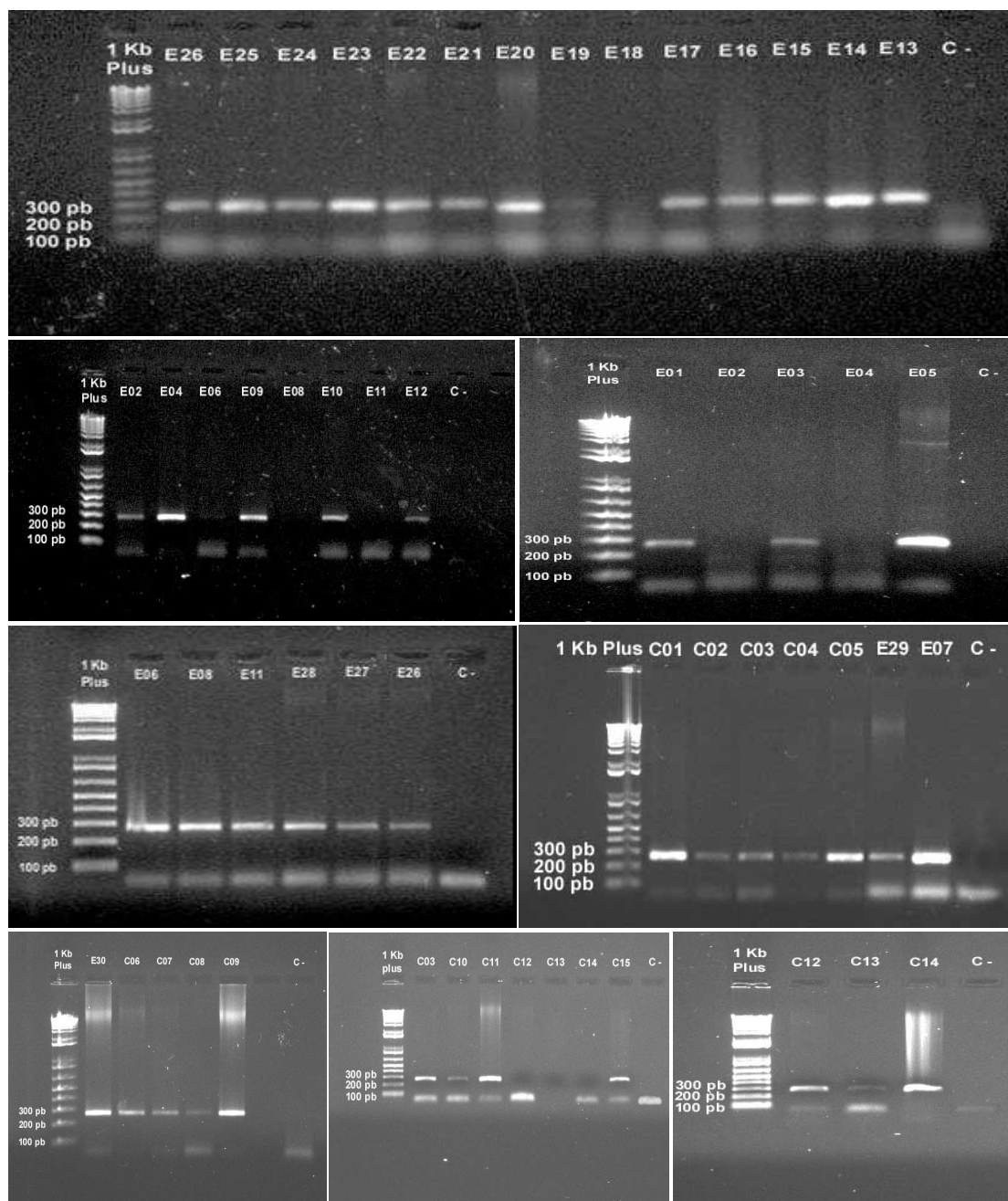


Figura 4- Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos da reação em cadeia da polimerase (PCR) do gene *xrccl* (248pb) dos indivíduos expostos a pesticidas (E), controles (C) e controle negativo (sem DNA).

Com as amostras amplificadas, foi possível realizar a restrição do fragmento do gene *xrccl* 399 clivado com a enzima *Nci* I (Figura 6) e a genotipagem. Um esquema ilustrativo auxilia a interpretação desses resultados (Figura 5).

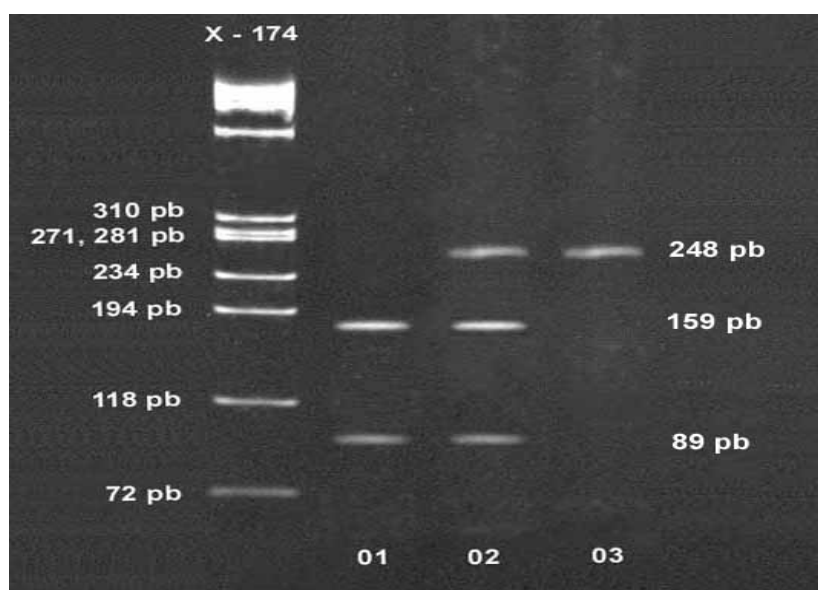


Figura 5- Ilustração esquemática: Poço 01: genótipo selvagem (Arg/Arg), fragmentos de 159, 89 pb; Poço 02: genótipo heterozigoto para mutação (Arg/Gln), fragmentos de 248, 159, 89 pb e Poço 03: genótipo homozigoto para mutação (Gln/Gln), fragmento 248 pb.

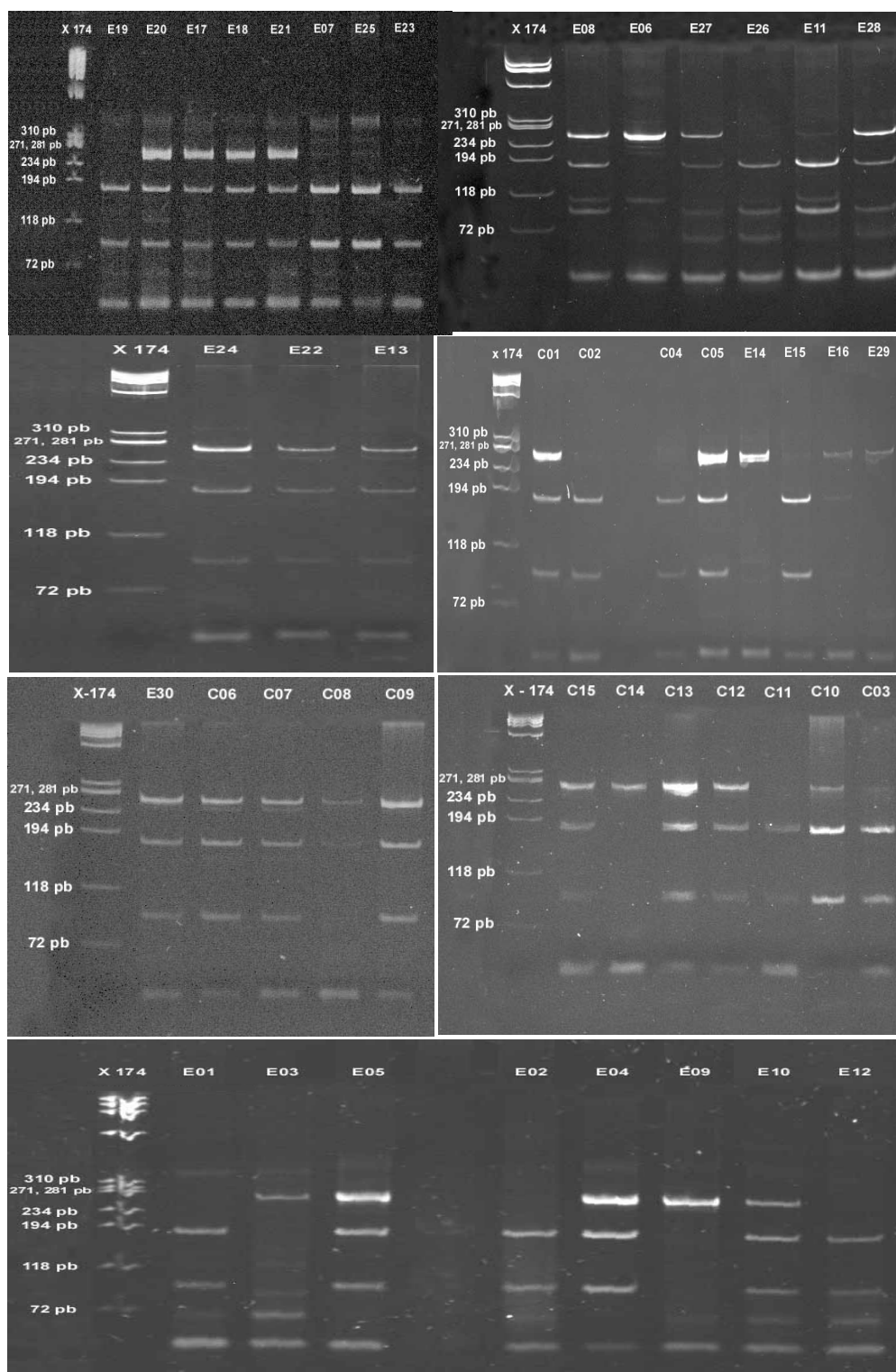


Figura 6 - Eletroforese em gel de poliacrilamida 6% dos produtos da restrição do gene *xrcc1*(Arg³⁹⁹Gln) dos indivíduos expostos e controles. Marcador de peso molecular: ØX174 digest Hae III.

O genótipo selvagem (Arg/Arg) foi encontrado em 33,33% dos indivíduos expostos e em 20% dos controles, o genótipo heterozigoto para a mutação (Arg/Gln) foi encontrado em 50% dos indivíduos expostos e em 73,33% dos controles e o genótipo homozigoto para mutação (Gln/Gln) foi encontrado em 16,66% dos indivíduos expostos e em 6,66% dos controles, sendo assim o menos freqüente (Figura 7).

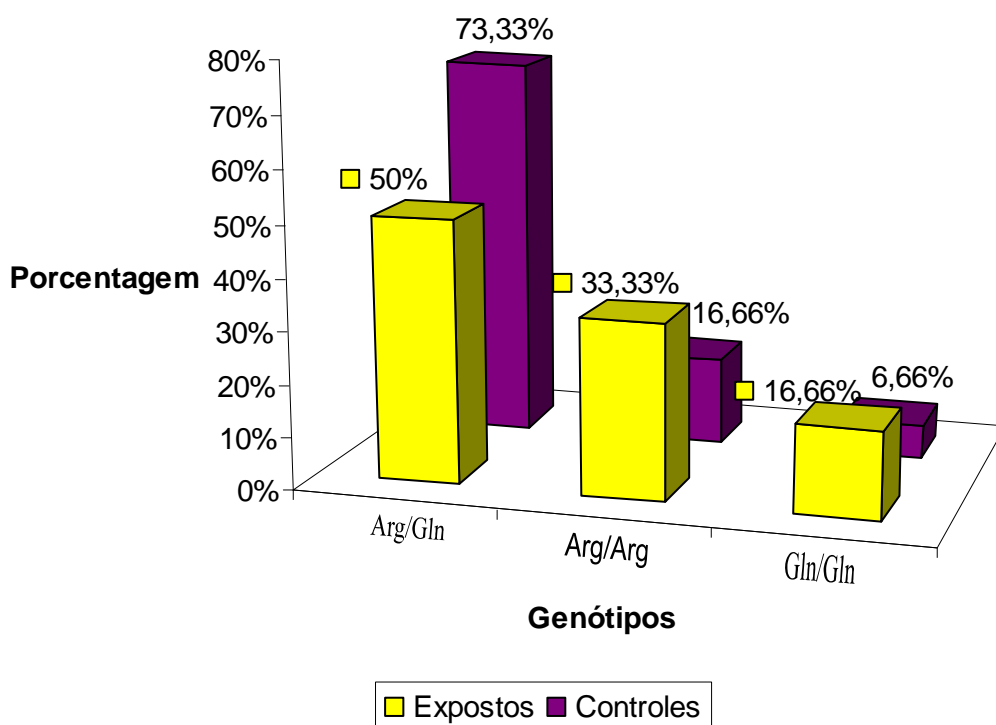


Figura 7 - Frequências dos genótipos do gene *xrc1* entre os indivíduos expostos e controles.

O teste estatístico de qui-quadrado demonstrou que a distribuição dos genótipos parece não diferir entre os grupos estudados (Tabela 3).

TABELA 3 – Características dos indivíduos expostos e controles em relação a genotipagem.

Genótipos	Indivíduos expostos (%)	Indivíduos controles (%)
Arg/Arg	10 (33,33)	05 (16,66)
Arg/Gln	15 (50)	11 (73,33)
Gln/Gln	05 (16,66)	01 (6,66)
$p = 0,3154$ $\chi^2 = 2,31$	$n = 30$	$n = 15$

GENE *xpd*

Dos produtos da PCR (Figura 8), 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 no laboratório de Biologia Molecular da Divisão Hemocentro na Faculdade de Medicina da Unesp (Botucatu). Dessa forma foi possível obter a amplificação do fragmento do gene *xpd* (161 pb) de todos os indivíduos estudados.

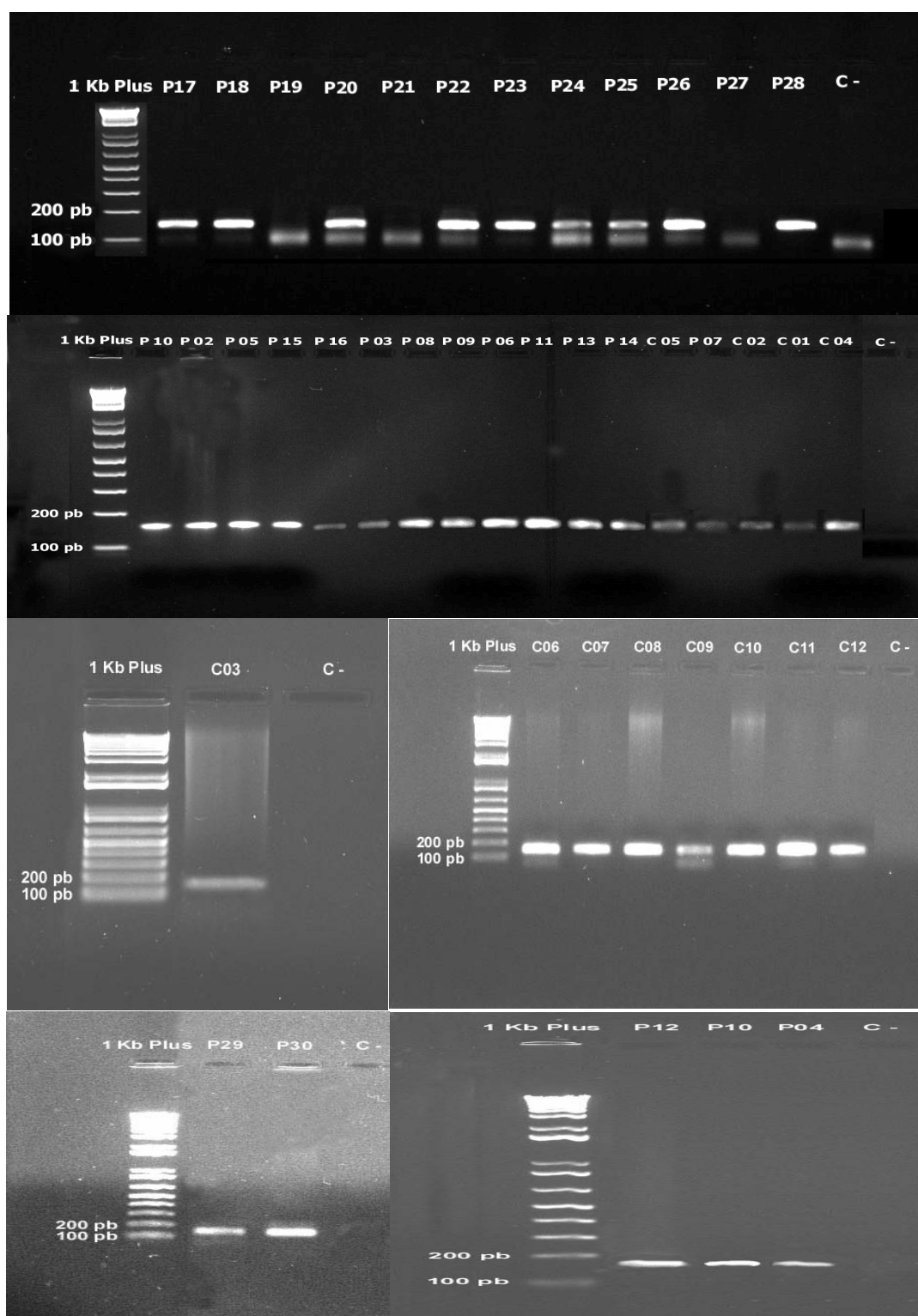


Figura 8- Produtos da reação em cadeia da polimerase (PCR) do éxon 23 do gene *xpd* 751 (161 pb) dos indivíduos expostos (P) e controles (C) e controle negativo (C-).

Com as amostras amplificadas, foi possível realizar a restrição do fragmento do gene *xpd* 751 clivado com a enzima *Pst* I (Figura 10) e posterior genotipagem dos indivíduos analisados. Um esquema ilustrativo auxilia a interpretação desses resultados (Figura 9).

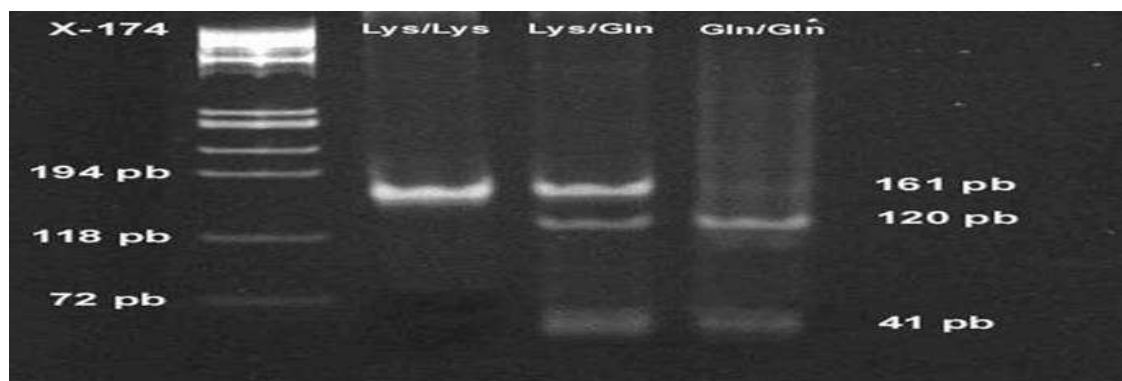


Figura 9 - Ilustração esquemática: Genótipo selvagem Lys/Lys: fragmento de 161 pb; Genótipo heterozigoto para mutação Lys/Gln: fragmentos de 161, 120 e 41 pb e Genótipo homozigoto para mutação Gln/Gln: fragmentos 120 e 41 pb.

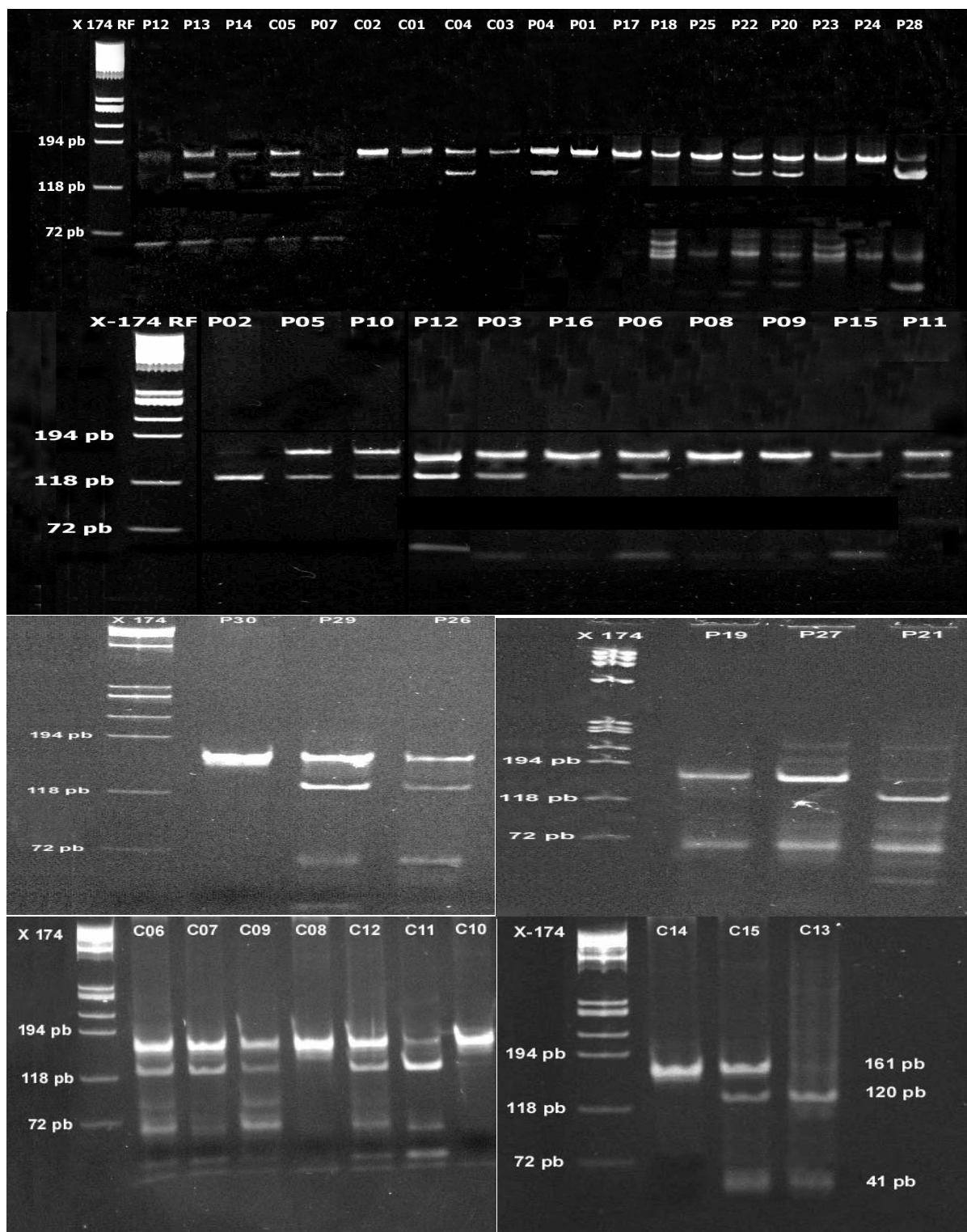


Figura 10 - Eletroforese em gel de poliacrilamida 6% dos produtos da restrição do éxon 23 do gene *xpd* (Lys⁷⁵¹Gln) dos indivíduos expostos e controles. Marcador de peso molecular: ØX174 digest Hae III.

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 (Figura 11).

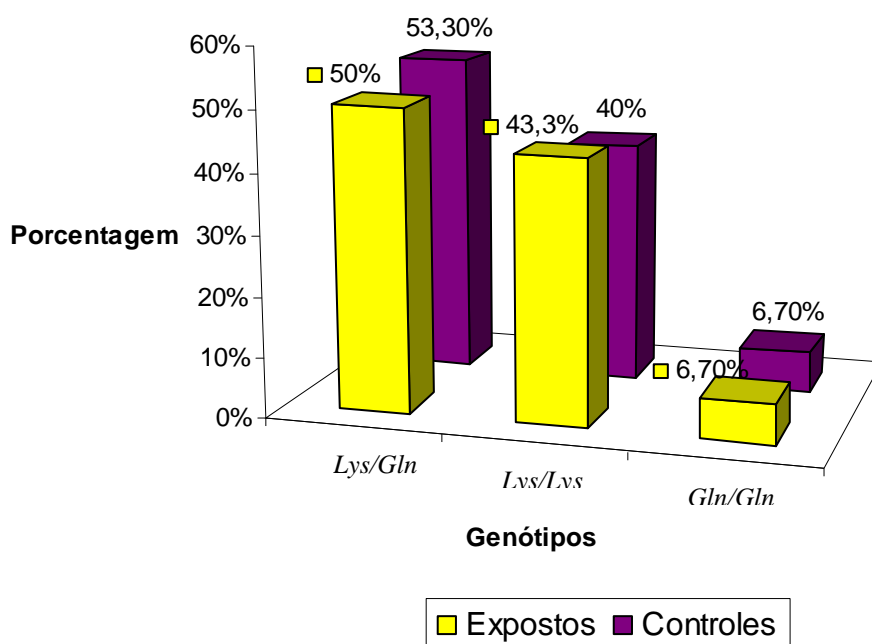


Figura 11 - Frequências dos genótipos do gene *xpd* encontrados nos grupos expostos e controles.

O teste estatístico do qui-quadrado demonstrou que a distribuição dos genótipos parece não diferir entre os grupos estudados (Tabela 4).

TABELA 4 – Características dos indivíduos expostos e controles em relação a genotipagem.

Genótipos	Indivíduos expostos (%)	Indivíduos controles (%)
Lys/Lys	13 (43,3)	06 (40)
Lys/Gln	15 (50)	08 (53,3)
Gln/Gln	02 (6,7)	01 (6,7)
$p = 0,9762$ $\chi^2 = 0,048$	$n = 30$	$n = 15$

As Tabelas 5 e 6 mostram os genótipos encontrados para os genes *xrcc1* e *xpd* nos indivíduos estudados (expostos e controles), o tempo de exposição a pesticidas e idades.

TABELA 5 – Dados referentes ao tempo de aplicação de pesticidas, idade, genótipos para os genes *xrcc1* e *xpd*.

Indivíduos	Tempo de aplicação de pesticidas (anos)	Idade (anos)	Genótipos (<i>xrcc1</i>)	Genótipos (<i>xpd</i>)
E01	30	64	Arg/Arg	Lys/Lys
E02	40	59	Arg/Arg	Gln/Gln
E03	30	58	Gln/Gln	Lys/Gln
E04	4	55	Arg/Gln	Lys/Gln
E05	15	66	Arg/Gln	Lys/Gln
E06	5	36	Gln/Gln	Lys/Gln
E07	4	32	Arg/Arg	Gln/Gln
E08	30	53	Arg/Gln	Lys/Lys
E09	12	33	Gln/Gln	Lys/Lys
E10	3	26	Arg/Gln	Lys/Gln
E11	2	24	Arg/Arg	Lys/Gln
E12	45	62	Arg/Arg	Lys/Gln
E13	1	23	Arg/Gln	Lys/Gln
E14	30	57	Gln/Gln	Lys/Lys
E15	2	43	Arg/Arg	Lys/Lys
E16	8	26	Arg/Gln	Lys/Gln
E17	36	56	Arg/Gln	Lys/Gln
E18	27	45	Arg/Gln	Lys/Lys
E19	20	42	Arg/Arg	Lys/Lys
E20	25	44	Arg/Gln	Lys/Gln
E21	5	17	Arg/Gln	Lys/Gln
E22	20	54	Arg/Gln	Lys/Gln
E23	10	49	Arg/Arg	Lys/Lys
E24	15	54	Arg/Gln	Lys/Lys
E25	9	27	Arg/Arg	Lys/Lys
E26	1	21	Arg/Arg	Lys/Gln
E27	19	33	Arg/Gln	Lys/Lys
E28	5	27	Arg/Gln	Lys/Lys
E29	15	40	Gln/Gln	Lys/Gln
E30	4	37	Arg/Gln	Lys/Lys

TABELA 6 - Dados referentes ao tempo de aplicação de pesticidas, idade, genótipos para os genes *xrcc1* e *xpd*.

Indivíduos	Tempo de aplicação de pesticidas (anos)	Idade(anos)	Genótipos (<i>xrcc1</i>)	Genótipos (<i>xpd</i>)
C01	0	41	Arg/Gln	Lys/Lys
C02	0	57	Arg/Arg	Lys/Lys
C03	0	44	Arg/Gln	Lys/Lys
C04	0	24	Arg/Arg	Lys/Gln
C05	0	21	Arg/Gln	Lys/Gln
C06	0	33	Arg/Gln	Lys/Gln
C07	0	27	Arg/Gln	Lys/Gln
C08	0	56	Arg/Gln	Lys/Lys
C09	0	27	Arg/Gln	Lys/Gln
C10	0	36	Arg/Gln	Lys/Lys
C11	0	19	Arg/Arg	Lys/Gln
C12	0	52	Arg/Gln	Lys/Gln
C13	0	49	Arg/Gln	Gln/Gln
C14	0	49	Gln/Gln	Lys/Lys
C15	0	42	Arg/Gln	Lys/Gln

Dentre os indivíduos expostos, 30% são heterozigotos para a mutação em ambos os genes (*xpd* Lys⁷⁵¹Gln e *xrcc1* Arg³⁹⁹Gln). No grupo controle, 40% também apresentam este genótipo para ambos os genes. Mutações nestes genes aumentam a suscetibilidade de desenvolvimento de alguns tipos de cânceres que serão discutidos a seguir.

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 (PAUMGARTTEN et al., 1998). Pesticidas são agentes químicos que geram espécies reativas de oxigênio (ROS) no organismo, podendo causar danos na molécula de DNA. Estes danos devem ser reparados pelos genes de reparo de DNA, que agem por diversas vias. O gene *xpd* faz reparo por excisão de nucleotídeos (NER- “nucleotide excision repair”), uma das mais importantes vias de reparo de danos causados por agentes exógenos e o gene *xrcc1*, reparo por excisão de bases (BER- “base excision repair”), primeiro mecanismo de correção de bases (BERRA et al., 2006). Mutações em genes de reparo de DNA podem levar a uma falha nestes mecanismos de reparo, contribuindo para o aparecimento de câncer. Sendo assim, a genotipagem de indivíduos expostos pode indicar a frequência dos genótipos mais suscetíveis em relação aos pesticidas.

Em nosso estudo, a frequência do genótipo mutado foi alta entre os grupos expostos e controles para os dois genes estudados (*xpd* e *xrcc1*). Além disso, 30% dos expostos e 40% dos controles apresentaram o genótipo heterozigoto para a mutação em ambos os genes de reparo estudados, levando assim a uma necessidade do monitoramento molecular do grupo exposto, já que além do genótipo mutado esses indivíduos estão expostos aos pesticidas e esta exposição pode aumentar o risco de desenvolver câncer.

Kelsey et al. (2004) relataram que os resultados de vários estudos epidemiológicos sugerem que o polimorfismo Arg³⁹⁹Gln do gene *xrcc1* pode influenciar na suscetibilidade de alguns tipos de cânceres.

O polimorfismo Lys⁷⁵¹Gln do gene *xpd* tem sido associado ao câncer de pulmão (DUEL et al., 2000; PALLI et al., 2001; SPITZ et al., 2001; HOU et al., 2002; QIAO et al., 2002; TANG et al., 2002; MATULLO et al., 2003). 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 este polimorfismo, 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.

Em um estudo envolvendo os genes *xpd* (Asp³¹²Asn e Lys⁷⁵¹Gln) e *xrcc1* (Arg³⁹⁹Gln), Zhou et al.(2003) concluíram que a associação entre eles é um fator importante para o aumento do risco de câncer de pulmão. Xing et al. (2002) obtiveram resultados que sugeriram uma associação entre o aumento do risco de desenvolvimento de carcinoma de células escamosas do esôfago e polimorfismos no *xrcc1* em um estudo de uma amostra da população coreana envolvendo os genes *xrcc1* (Arg¹⁹⁴Trp e Arg³⁹⁹Gln) e *xpd* (Asp³¹²Asn e Lys⁷⁵¹Gln). Dos indivíduos expostos analisados, nove apresentaram mutação tanto no gene *xrcc1* (Arg³⁹⁹Gln), como no gene *xpd* (Lys⁷⁵¹Gln). Benjamin et al. (2004) encontraram associação entre o risco de câncer de próstata e os genótipos Asn/Asn e Gln/Gln dos genes *xrcc1* e *xpd*, respectivamente.

Em nosso trabalho, 13 indivíduos são fumantes. Hu et al. (2005) estudaram uma possível interação entre os polimorfismos Arg¹⁹⁴Trp e Arg³⁹⁹Gln do gene *xrcc1*, câncer de pulmão e exposição ao tabaco e não encontraram associações significantes entre os genótipos determinados com o aumento do risco deste câncer nos pacientes estudados. Shen et al. (2003) encontraram uma associação entre o gene *xrcc1* com câncer de bexiga, pois foi possível verificar que o alelo Gln deste gene tem um efeito protetor ao aparecimento do câncer de bexiga em fumantes.

Zhou et al. (2003) relataram uma associação entre o uso crônico de cigarro com câncer de pulmão. O polimorfismo Lys⁷⁵¹Gln do gene *xpd* foi associado em vários estudos ao câncer de pulmão. Dentre os pacientes que apresentaram esta mutação no gene *xpd* cinco relataram fazer ou já ter feito uso de cigarro.

Em nosso estudo não foi encontrada uma diferença significativa entre os genótipos do grupo exposto e controle para os genes *xpd* e *xrcc1* em uma avaliação inicial de 30 expostos e 15 controles.

O estudo de Deligezer, Akisik e Dalay (2007) demonstrou que não houve uma associação entre o polimorfismo Arg³⁹⁹Gln do gene *xrcc1* e a leucemia mieloide crônica, pois a distribuição dos genótipos Arg/Arg, Arg/Gln e Gln/Gln era semelhante entre o grupo controle e o grupo de indivíduos com leucemia mieloide crônica. Seedhouse et al. (2002) encontraram uma diferença significativa na distribuição de genótipos do polimorfismo Arg³⁹⁹Gln no *xrcc1* entre grupo de pacientes em tratamento com leucemia mieloblástica aguda e o grupo controle. A presença do alelo Gln indicou um efeito protetor nos indivíduos do grupo controle comparado com pacientes em tratamento. Um outro estudo realizado por Duarte et al. (2005) na região sudeste do estado de São Paulo demonstraram que a frequência dos genótipos do polimorfismo Arg³⁹⁹Gln do gene *xrcc1* dessa população com descendência

européia foi de 43% para Arg/Arg, 40% para Arg/Gln e 17% para Gln/Gln, e a frequência entre os indivíduos brasileiros com descendência africana foi de 64% para Arg/Arg, 27% para Arg/Gln e 9% para Gln/Gln. Dufloth et al. (2005), estudaram a frequência do genótipo Lys/Gln do gene *xpd* de 86 mulheres com câncer de mama e 295 sem câncer de mama em uma amostra da população de Campinas, e encontraram uma alta frequência deste genótipo tanto no grupo exposto como no grupo controle. 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). Estes estudos demonstram que os genótipos Arg/Gln do gene *xrcc1* e Lys/Gln do gene *xpd* são comuns na população brasileira estudada até o momento.

Dos indivíduos expostos analisados, dois são homozigotos para a mutação (Gln/Gln) no gene *xpd* e dos controles um indivíduo apresenta esta mutação. 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 resultados deste trabalho podem ser complementados com o aumento da amostra, introdução de um grupo com câncer, análise de outros genes de reparo e também a realização da análise citogenética para avaliação da instabilidade cromossômica.

CONCLUSÕES

A prevalência dos genótipos heterozigotos para a mutação Arg/Gln no gene *xrcc1* e Lys/Gln no gene *xpd* foi observada em metade dos indivíduos expostos e em pouco mais da metade dos indivíduos controles, sendo portanto, os genótipos mais frequentes.

O achado de uma frequência elevada da mutação em indivíduos expostos e controles, requer 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, bem como um trabalho educativo relativo às noções de biossegurança.

REFERÊNCIAS

ALAVANJA, M. C.; HOPPIN, J. A.; KAMEL, F. Health effects of chronic pesticide exposure câncer and neurotoxicity. *Public Health*, v. 25, p. 155-197, 2004.

BENJAMIM, A. et al. DNA Repair Gene XRCC1 and XPD Polymorphisms and risk of prostate cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers e Prevention*, v. 13, p. 23-29, 2004.

BERRA, C. M.; MENCK, C. F. M. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. *Quim. Nova*, v.29, n. 6, p. 1340-1344, 2006.

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 melanoma 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.

DELIGEZER, U.; AKISIK, E. E.; DALAY, N. Lack of association of XRCC1 codon 399Gln polymorphism with chronic myelogenous leukemia. *Anticancer res.*, v. 26, p. 2453-2456, jul. 2007.

DELIGEZER, U.; DALAY, N. Association of the XRCC1 gene polymorphisms with cancer risk in Turkish breast cancer patients. *Exp Mol Med*, v. 36, n. 6, p. 572-575, dec. 2004.

DUARTE, M. C. et al. Polymorphisms of the DNA repair genes XRCC1 e XRCC3 in Brazilian population. *Genetics and Molecular Biology*, v.28, n. 3, p. 397-401, 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 Ressearch*, 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.

HU, Z. et al. A promoter polymorphism (-77T>C) of DNA repair gene XRCC1 is associated with risk of lung cancer in relation to tobacco smoking. *Pharmacogenet Genomics*, v. 15, n. 7, p. 457-463, jul. 2005.

KELSEY, K. T. et al. A population-based case-control study of the XRCC1 Arg399Gln polymorphism and susceptibility to bladder cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, v. 13, n. 8, p. 1337-1341, aug. 2004.

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

LEE, S. G. et al. Genetic polymorphisms of XRCC1 and risk of gastric cancer. *Cancer Lett*, v. 187, n. 1-2, p. 53-60, dec. 2002.

LOPEZ, M. F. C. et al. Polymorphisms in XPC, XPD, XRCC1, and XRCC3 DNA repair genes and lung cancer risk in a population of Northern Spain. *BMC Cancer*, v.16, p.162-199, 2007.

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.

MIN, S. et al. Polymorphisms in DNA repair genes and risk of non-Hodgkin's lymphoma in New South Wales, Australia. *Haematologica*, v. 92, p.1180-1185, 2007.

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.

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.

POPANDA, O. et al. Specific combinations of DNA repair gene variants and increase risk for non-small cell lung cancer. *Carcinogenesis*, v. 25, n. 12, p. 2433-2441, 2004.

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.

SEEDHOUSE, C. et al. The genotype distribution of the XRCC1 gene indicates a role for base excision repair in the development of therapy-related acute myeloblastic leukemia. *Blood*, v. 100, n. 10, p. 3761-3766, nov. 2002.

SHEN, M. et al. Polymorphisms of the DNA repair genes XRCC1, XRCC3, XPD, interaction with environmental exposures, and bladder cancer risk in a case-control study in northern Italy. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, v. 12, p. 1234-1240, nov. 2003

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

SMITH, T. R. et al. Polymorphisms of XRCC1 and XRCC3 genes and susceptibility to breast cancer. *Cancer Lett*, v. 190, n. 2, p. 183-190, feb. 2003.

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.

TAE, K. et al. Association of DNA repair gene XRCC1 polymorphisms with head and neck cancer in Korean population. *Int J Cancer*, v. 11, n. 5, p. 805-808, sep. 2004.

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.

VOGEL, U. et al. No association between base excision repair gene polymorphisms and risk of lung cancer. *Biochem Genet*, v. 42, p. 453-460, 2004.

WEBER, et al. ERCC2: cDNA cloning and a molecular characterization of a human nucleotide excision repair gene with high homology to yeast RAD3. *EMBO J.*, n. 9, p.1437-1447, 1990.

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. DNA repair gene XRCC1 polymorphisms, smoking, and esophageal cancer risk. *Cancer Detect Prev*, v. 28, n. 3, p. 194-199, 2004.

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.

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.

ZIENOLDDINY, S. et al. Polymorphisms of DNA repair genes and risk of non-small cell lung cancer. *Carcinogenesis*, v. 27, n. 3, p. 360-367, 2006.

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.

JAREMKO, M. et al. Polymorphism of the DNA repair enzyme XRCC1 is associated with treatment prediction in anthracycline and cyclophosphamide/methotrexate/5-fluorouracil-based chemotherapy of patients with primary invasive breast cancer. *Pharmacogenet Genomics*, v. 17, n. 7, p. 529-538, jul. 2007.

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, 2003.

XU, J. N. et al. Analysis for the association between genetic polymorphisms of XRCC1, XPD, XRCC3, CCND1 and the latency of the occupational chronic benzene poisoning. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi*, v. 42, n.2, p. 114-117, 2007.

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

TERMO DE CONSENTIMENTO ESPECÍFICO PARA
PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA APLICADA

Eu, _____, tendo sido satisfatoriamente informado sobre a colaboração nas pesquisas: **“ESTUDO DE POLIMORFISMOS NOS GENES DE REPARO *xrcc1* E *xpd* 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, localiza 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:.....