

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**INFLUÊNCIA DE POLIMORFISMOS EM GENES DE METABOLISMO DE  
XENOBIÓTICOS E REPARAÇÃO DE DNA NO RISCO OCUPACIONAL DE  
MINEIROS DE CARVÃO A CÉU ABERTO**

**Lyda Espitia-Pérez**

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

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

**Porto Alegre, Junho 2011**

*A Jesus, o amigo que nunca falha*

*A meus pais, meus cúmplices eternos*

*A meus irmãos, minha fonte de energia*

*A minha família, tios, primos e afilhados, por ser sempre minha rede de apoio*

*A meus amigos, que mais do que isso, são parceiros e parte vital da minha vida*

*Ao Brasil.....*

*Basta un poco de espíritu aventurero para estar siempre satisfechos, pues en esta vida, gracias a Dios, nada sucede como deseábamos, como suponíamos, ni como teníamos previsto.*

*Noel Clarasó*

Esta dissertação foi desenvolvida nos Laboratório de Investigación Biomédica y Biología Molecular de la Universidad del Sinú em Montería-Colômbia, no Laboratório de Imunogenética do Departamento de Genética e no Laboratório de Radiobiología Molecular do Departamento de Biofísica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul). Foi financiado pelo Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnologia e Innovación de Colombia (COLCIENCIAS), pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pelo Instituto de Educação para Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação Tecnológica – ROYAL, Centro de Biotecnologia (UFRGS).

## AGRADECIMENTOS

Ao Professor Henriques, por acreditar em mim, por apoiar o meu sonho de estudar no Brasil, pelo exemplo, o conhecimento compartilhado e pelas horas de fome discutindo os resultados, muito obrigada.

Ao professor Milton, por ser o primeiro em infundir em mim os desejos de pesquisar e estudar sem importar as barreiras, pelas palavras de alento nos momentos de dúvida ou tristeza, pela luta conjunta, pela amizade... Obrigada maestro.

A Professora Juliana da Silva, quem sempre esteve disposta a me ajudar em tudo, por ter sempre palavras de encorajamento e otimismo, pela valiosa amizade e pela valiosa ajuda no desenvolvimento deste trabalho

A Izabel Villela, porque fez parte vital do meu sonho de chegar ao Brasil, por seu incansável apoio, pela sua amizade, pelo carinho e por fazer me sentir em casa.

A Grethel, minha melhor amiga, quase irmã, obrigada por fazer os dias tristes mais fáceis, pelo apoio incondicional, pela companhia, pela amizade sincera e pelo bom trabalho.

Aos Professores membros da minha Comissão de Acompanhamento: Prof. Dr. Guido Lenz e Prof. Dr. Rogério Margis, pelo apoio e a ajuda constante.

Ao Sindicato de trabalhadores do Cerrejón, pela ajuda na realização do estudo e pela boa disposição.

A todo o corpo de professores do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, pelos conhecimentos compartilhados e os valiosos ensinamentos.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, principalmente à Silvia e Luciano que sempre foram de muita ajuda. Obrigada pelo carinho, pela amizade e pela paciência com meu portunhol.

Aos meus amigos do Lab. 210: Cristiano, Clara, Nusha, Patrícia, Ângelo, muito obrigada pelo carinho, pelos momentos de descontração, pela ajuda no trabalho e pela amizade sincera.

A professora Kátia Kvitko e a Paula Rohr pela inestimável ajuda no estudo dos polimorfismos e na análise dos resultados.

A Vilma e Juan, meus pais, meus eternos cúmplices e o maior suporte da minha vida, pelos sacrifícios e pelas palavras de encorajamento. Obrigada por ir junto neste sonho. As minhas conquistas mais do que minhas são de vocês.

Aos meus irmãos, Pedro e Juan David, os melhores amigos e parceiros que alguém possa pedir e ter encontrado no mundo inteiro.

Aos meus tios e tias, pelo carinho e as palavras sempre certas, especialmente Angela, minha segunda mãe, Rosa, Piedad, Fernanda, Edilsa, Marta, Juanita, Mochi, Dominga e Fidencia. Obrigada por ser parte da minha vida!!!

Aos meus afilhados Juan Jo e Alejandro, são as duas coisas que mais amo na vida.

As minhas amigas de Genotox: Miriana Machado, Miriam Benicio, Márcia Vaz, Bethânia Brenner, Jaqueline Silveira e a Mônica Acioli, muito obrigada pelo carinho, pelos bons momentos, pelas aulas de português e pela amizade.

A Carolina, tchê, eu não sabia que tinha uma irmã na Argentina!!!. Sem tua ajuda tudo teria sido difícil demais. Obrigada pelos conselhos, a amizade e os bons momentos em casa.

Aos maravilhosos amigos que ficaram na Colômbia e que me esperam com os braços abertos: Juan Dau Sánchez, María Cecilia Sánchez, Javier Arrieta, Yeni Guzmán, Oscar Montiel, Marco Támara, Ronald Ayazo, Hugo Brango, Juan Carvajal, Raúl Pedroza, David Mestra, Jaime Luna, Shyrli Salcedo, Magdalena Toscano, Nubia Yandar, Catalina Tovar, Elkin Agamez e Gina Padilla.

A meus grandes amigos de Porto Alegre: Dayana, Fabrício, Leidy, Adriana, Ricardo, Felipe, Leandro, Angélica, Fausto, Lila, Bruno, Maurício e José Vargas. Que boa turma, que boa família urbana!

A Tila, Andy, Milo, Maya, Tila II e Pechi.

A todos aqueles que são parte da minha vida, aqueles que compartilham meus sonhos e que sempre estão ali para mim, e a todos aqueles que prometem ser importantes.

**Obrigada!**

**Obrigada!**

**Obrigada!**

## ESTRUTURAÇÃO DA TESE

A presente dissertação encontra-se estruturada da seguinte forma: uma introdução geral, os objetivos (gerais e específicos) e dois capítulos principais, um escrito na forma de artigo científico e outro mostrando resultados que serão usados em um segundo artigo, discussão, conclusões e perspectivas.

A introdução aborda alguns dados atuais sobre o carvão da Colômbia: características, produção e uso, assim como recentes evidências sobre os efeitos genotóxicos de algumas das substâncias geradas durante as atividades de exploração em minas a céu aberto. Também são abordados os conceitos de biomarcador e epidemiologia molecular, e são revisadas algumas das vias de metabolização de xenobióticos e de reparação do DNA, junto com o papel dos genes de cada via que foram objetivos de estudo desta tese.

O Capítulo I apresenta a possível interação entre a presença de dano e alguns polimorfismos em genes do metabolismo de xenobióticos, avaliando as maiores vias de metabolização, as vias do citocromo P450 (*CYP1A1<sub>Msp1</sub>*) e da Glutathione (*GSTM1<sub>nulo</sub>* e *GSTT1<sub>nulo</sub>*).

O Capítulo II aborda o estudo sobre a possível influência de alguns polimorfismos em genes de reparação de DNA da via BER (*XRCC1<sub>194Trp</sub>* e *OGG1<sub>326Cys</sub>*) sobre a elevada frequência de MN na população estudada.

Na sequência, é apresentada uma discussão geral correlacionando os capítulos acima, e as possíveis hipóteses que poderiam explicar os resultados obtidos, as conclusões e perspectivas.

No ANEXO 1 encontra-se o artigo publicado com os dados sobre as frequências de MN em linfócitos de sangue periférico obtidos dentro do presente trabalho e no ANEXO 2, está o Termo de Consentimento Livre Esclarecido que foi assinado pelos pacientes que decidiram participar do estudo.

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	I
ESTRUTURAÇÃO DA TESE	III
SUMÁRIO	IV
LISTA DE ABREVIATURAS	VIII
LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE TABELAS	XI
RESUMO	XII
ABSTRACT	XIV
<b>INTRODUÇÃO</b>	19
<b>1. O CARVÃO</b>	20
1.1 O carvão na Colômbia	21
1.1.1 Reservas	21
1.1.2 Produção	21
1.1.3 Composição do carvão de Cerrejón	22
1.2 Efeitos genotóxicos da mineração de carvão	22
<b>2. EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR</b>	24
2.1 Biomarcadores de exposição	25
2.2 Biomarcadores de efeito	26
2.3 Biomarcadores de suscetibilidade	26
2.3.1 Genes de metabolismo	27
2.3.2 Genes de Reparação do DNA	31
2.3.2.1 A proteína de reparação XRCC1	32
2.3.2.2 A proteína de reparação OGG1	34
<b>OBJETIVOS</b>	38



GERAL	39
ESPECÍFICOS	39
<b>CAPÍTULO I</b>	<b>40</b>
<b>ARTIGO: CYP1A1, GSTM1 AND GSTT1 POLYMORPHISMS AND LACK OF MODULATION OF DNA DAMAGE IN OPEN-CAST COAL MINERS</b>	<b>41</b>
ABSTRACT	42
INTRODUCTION	43
METHODS	46
Study population and sample collection	46
Blood Samples Collection	46
Micronucleus Assay	47
Comet Assay Test	47
DNA isolation	48
Statistical analysis	52
RESULTS	53
DISCUSSION	58
ACKNOWLEDGMENTS	61
REFERENCES	62
<b>CAPÍTULO II</b>	<b>67</b>
APRESENTAÇÃO	68
1. MATERIAIS E MÉTODOS	69
1.1 Detecção dos polimorfismos para <i>XRCC1</i> <sub>194Trp</sub> e <i>OGG1</i> <sub>326Cys</sub>	69
1.1.1 Condições de amplificação e digestão do polimorfismo <i>XRCC1</i> <sub>194Trp</sub>	69
1.1.2 Condições de amplificação e digestão do polimorfismo <i>OGG1</i> <sub>326Cys</sub>	71

1.2 Análise estatística	73
2. RESULTADOS	74
<b>DISCUSSÃO</b>	79
DETECÇÃO DE DANO CITOGÉNÉTICO E GENOTÓXICO EM TRABALHADORES DE MINERAÇÃO DE CARVÃO A CÉU ABERTO	80
EFEITO DOS POLIMORFISMOS EM GENES DE METABOLISMO DE XENOBIÓTICOS SOBRE AS FREQUÊNCIAS DE MICRONÚCLEOS E O DANO NO DNA DETECTADO PELO ENSAIO COMETA EM POPULAÇÕES EXPOSTAS A RESÍDUOS DE MINERAÇÃO DE CARVÃO A CÉU ABERTO	83
EFEITO DOS POLIMORFISMOS EM GENES DE REPARAÇÃO DE DNA DA VIA BER SOBRE AS FREQUÊNCIAS DE MICRONÚCLEOS PRESENTES EM POPULAÇÕES EXPOSTAS A RESÍDUOS DE MINERAÇÃO DE CARVÃO A CÉU ABERTO.	86
<b>CONCLUSÕES</b>	90
CONCLUSSÃO GERAL	91
CONCLUSÕES ESPECÍFICAS	91
<b>PERSPECTIVAS</b>	93
<b>REFERÊNCIAS</b>	95
<b>ANEXOS</b>	118
ANEXO I - ARTIGO: ASSESSMENT OF DNA DAMAGE IN COAL OPEN-CAST MINING WORKERS USING THE CYTOKINESIS-BLOCKED MICRONUCLEUS TEST AND THE COMET ASSAY	119
ANEXO II - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	120
ANEXO III – QUESTIONÁRIO INDIVIDUAL	124

**LISTA DE ABREVIATURAS**

<b>AC</b>	– Alterações cromossômicas
<b>AHH</b>	– Aril Hidrocarboneto Hidroxilase
<b>AhR</b>	– Aril hydrocarbon Receptor/Receptor Aril hidrocarbono
<b>Alsil</b>	– Silicato de Alumínio
<b>BER</b>	– Base Excision Repair/Reparo por Excisão de Bases
<b>CA</b>	– Chromosome Alterations/Alterações cromossômicas
<b>CCSEM</b>	– Computer-Controlled Scanning Electron Microscopy/Microscopia Eletrônica de Varredura Controlada por Computador
<b>CYP450</b>	– Cytochrome P450/Citocromo P450
<b>DF</b>	– Damage Frequency/Frequência de dano (Comet Assay)
<b>DI</b>	– Damage Index/Índice de Dano (Comet Assay)
<b>ERO</b>	– Espécie Reativa de Oxigênio
<b>GST</b>	– Glutathione S-transferase
<b>HAPs /PAHs</b>	– Hidrocarboneto Aromático Policíclico/Polycyclic Aromatic Hydrocarbon
<b>MN</b>	– Micronúcleos
<b>OGG1</b>	– 8-Oxoguanine DNA Glycosylase
<b>RR</b>	– Risco Relativo
<b>TCI</b>	– Troca de cromátides irmãs
<b>Si</b>	– Sílica
<b>Si-alsi</b>	– Silicato de alumínio e sílica
<b>Tail % DNA</b>	– Porcentagem de DNA na cauda (Comet Assay)
<b>XRCC1</b>	– X-Ray Repair Cross-Complementing Protein

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Título	Página
<b>FIGURA 1.</b>	Modelo de reparação de quebras de fita simples de DNA mediado pelo BER.	33
<b>FIGURA 2.</b>	Estrutura da proteína e do gene XRCC1 humano. (a) Domínios e regiões de interação com outros componentes da BER. (b) Estrutura do gene com as SNPs mais comuns e estudadas.	34
<b>FIGURA 3.</b>	Reparação pela via curta de BER da 8-OH-G em células de mamíferos. <b>Primeiro passo</b> , uma DNA glicosilase reconhece a base danificada e quebra a ponte N-glicosídica. <b>Segundo passo</b> , quebra do sítio AP por uma AP endonuclease para a geração de extremidades 3'OH e 5'P. <b>Terceiro passo</b> , incorporação de um nucleotídeo pela DNA polimerase. <b>Quarto passo</b> , a fita de DNA é selada pela DNA ligase, restaurando sua configuração inicial, XRCC1 atua como uma proteína suporte trazendo a polimerase e a ligase ao local da reparação.	35
<b>FIGURA 4.</b>	PCR-RFLP analysis for the presence/absence of the <i>CYP1A1</i> <sub>MspI</sub> polymorphism: <b>Lane 1</b> a homozygous individual ( <i>m1</i> allele without <i>MspI</i> site 340 bp fragment), <b>Lane 2</b> heterozygote individual ( <i>m1/m2</i> 340, 200 and 140 bp fragments) and in <b>Lane 3</b> homozygous individual ( <i>m2</i> allele with the <i>MspI</i> site) generates 200 and 140 bp fragments. <b>M</b> -Ladder marker.	50
<b>FIGURA 5.</b>	Multiplex PCR products for the presence/absence of <i>GSTM1</i> and <i>GSTT1</i> : <b>Lane 1:</b> <i>GSTM1/T1</i> <sub>positive</sub> ; <b>Lane 2:</b> <i>GSTM1</i> <sub>null</sub> , <i>GSTT1</i> <sub>positive</sub> ; <b>Lane 3:</b> <i>GSTM1/T1</i> <sub>null</sub> ; <b>Lane 4:</b> <i>GSTM1</i> <sub>positive</sub> , <i>GSTT1</i> <sub>null</sub> . Band at 312 bp corresponds to the internal control ( <i>CYP1A1</i> gene fragment). The presence or absence of <i>GSTM1</i> and <i>GSTT1</i> genes was detected by the presence or absence of a band at 480 bp (corresponding to <i>GSTT1</i> ) and a band at 215 bp (corresponding to <i>GSTM1</i> ).	51

<b>Figura</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
<b>FIGURE 6.</b>	Association of time of exposure to coal mining residues with frequency of Micronucleus in 2000 binucleated cells.	54
<b>FIGURA 7.</b>	Análise PCR-RFLP para o polimorfismo XRCC1194Trp. Linha 1: Indivíduo heterozigoto (Arg/Trp, fragmentos de 431 e 368 pb), Linha 3: Indivíduo selvagem (Arg/Arg sem sítio de corte, fragmento de 431 pb) e Linha 8: Indivíduo homozigoto mutante (Trp/Trp, fragmentos de 368 pb). M: Marcador de peso.	70
<b>FIGURA 8.</b>	Análise PCR-RFLP para o polimorfismo OGG1326Cys Linha 1: Indivíduo selvagem (Ser/Ser sem sitio de corte, fragmento de 553 pb), Linha 2: Indivíduo heterozigoto (Ser/Cys, fragmentos de 553, 399 e 154 pb), e Linha 3: Indivíduo homozigoto mutante (Cys/Cys, fragmentos de 399 e 154 pb). M: Marcador de peso.	72

## LISTA DE TABELAS

Tabela	Título	Página
<b>TABELA 1.</b>	Resultados conflitantes dos polimorfismos de metabolismo de xenobióticos e MN em linfócitos de sangue periférico dependendo da exposição ocupacional.	30
<b>TABELA 2.</b>	Resultados conflitantes dos polimorfismos <i>XRCC1</i> <sub>194Trp</sub> <i>OGG1</i> <sub>326Cys</sub> e MN em linfócitos de sangue periférico dependendo da exposição ocupacional.	37
<b>TABLE 3.</b>	Distribution of <i>CYP1A1</i> , <i>GSTM1</i> and <i>GSTT1</i> genotypes and variant alleles frequencies in non-exposed control and exposed groups.	55
<b>TABLE 4.</b>	Poisson regression analysis of Micronucleus: Effect of individual genotype in non-exposed control and coal open-cast mining residues exposed groups.	56
<b>TABLE 5.</b>	Effect of individual genotype on Comet assay parameters in non-exposed and coal open-cast mining residues exposed groups (mean and standard deviation).	57
<b>TABELA 6.</b>	Detalhes técnicos usados para as análises do PCR-RFLP.	71
<b>TABELA 7.</b>	Frequência de polimorfismos de genes de reparação em diferentes populações.	75
<b>TABELA 8.</b>	Distribuição dos genótipos de <i>XRCC1</i> e <i>OGG1</i> e das frequências alélicas nos grupos controle e expostos.	76
<b>TABELA 9.</b>	Distribuição das frequências observadas e esperadas para os grupos casos e controles.	77
<b>TABELA 10.</b>	Análise da regressão de Poisson para os Micronúcleos: efeito dos genótipos individuais em grupos controles-não expostos e nos grupos expostos a resíduos de mineração de carvão.	78

## RESUMO

A Colômbia tem uma das maiores reservas de carvão do mundo, sendo o quinto exportador mundial do carvão de tipo térmico. Nos processos de extração de carvão a céu aberto uma grande quantidade de partículas de pó e metais pesados são liberados à atmosfera, onde podem formar misturas complexas, constituindo um risco significativo para a saúde dos trabalhadores ocupacionalmente expostos. Além disso, nas minas a céu aberto, o carvão extraído é armazenado na presença de luz solar, gerando incêndios espontâneos que constituem uma importante fonte de emissão de Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (HAPs) depois de sua combustão incompleta. O objetivo do presente estudo foi avaliar se polimorfismos nos genes do metabolismo de xenobióticos *CYP1A1<sub>Msp1</sub>*, *GSTM1<sub>nulo</sub>*, *GSTT1<sub>nulo</sub>* e de reparação do DNA *XRCC1<sub>194Trp</sub>* e *OGG1<sub>326Cys</sub>* podem modificar a suscetibilidade individual aos efeitos adversos causados pela exposição aos resíduos de mineração de carvão, considerando a formação de Micronúcleos (MN) e alguns parâmetros do Ensaio Cometa (Índice de Dano - DI, Frequência de dano - DF e porcentagem de DNA na cauda - Tail % DNA) como biomarcadores de mutagenicidade e genotoxicidade. A população de estudo foi formada por 100 trabalhadores de mineração de carvão a céu aberto ocupacionalmente expostos a resíduos de mineração e 100 controles não expostos. O estudo foi realizado na área mineira de “El Cerrejón”, a maior mina de carvão a céu aberto do mundo, localizada em Guajira, ao Norte da Colômbia. As análises dos valores do Ensaio Cometa demonstraram um incremento significativo no DI, DF e porcentagem de DNA na cauda (Tail % DNA) ( $p < 0,001$ ) no grupo exposto, comparado com o grupo controle. Também houve um aumento significativo na frequência de MN em trabalhadores expostos, representado por um risco relativo (RR) de quase o triplo (2,88, 95% CI 2,525 – 3,284,  $p < 0,001$ ) para a população exposta, representando um elevado risco de câncer em relação aos controles correspondentes. Apesar destes, os resultados demonstraram que os polimorfismos nos genes do metabolismo (*CYP1A1<sub>Msp1</sub>*, *GSTM1<sub>nulo</sub>*, *GSTT1<sub>nulo</sub>*) e nos genes de reparação do DNA (*XRCC1<sub>194Trp</sub>* e *OGG1<sub>326Cys</sub>*) não tiveram nenhum impacto sobre as frequências de MN em linfócitos periféricos dos trabalhadores expostos. Da mesma forma, polimorfismos em genes de metabolismo de xenobióticos (*GSTM1<sub>nulo</sub>*, *GSTT1<sub>nulo</sub>* e *CYP1A1<sub>Msp1</sub>*) não influenciaram os

níveis de dano no DNA detectados pelo Ensaio cometa. O genótipo *XRCC1*<sub>194Trp</sub>/- apresentou uma tendência de proteção em indivíduos expostos, evidenciada em uma diminuição na frequência de MN, embora não tenha sido significativa. A nosso conhecimento, este estudo fornece os primeiros dados para a Colômbia sobre o risco genotóxico associado à exposição os resíduos de mineração de carvão a céu aberto e contribui para estabelecer um mapa geral das frequências genotípicas representativas em populações Latino-Americanas, as quais apresentam uma alta complexidade devido ao elevado grau de mistura étnica.



**ABSTRACT**

Colombia has one of the world's largest coal reserves being the fifth biggest thermal coal exporter world-wide. In open-cast coal mining extraction, large amounts of dust particles and heavy metals are released into the atmosphere, where they can form complex mixtures, representing a significant health risks to occupationally exposed workers. In addition, in open-cast mines, extracted coal is stored under sunlight, causing spontaneous fires, being an important source of Polycyclic Hydrocarbons Aromatic (PHAs) emission after incomplete combustion. The aim of our study was to evaluate if polymorphisms in metabolisms genes *CYP1A1<sub>Msp1</sub>*, *GSTM1<sub>null</sub>*, *GSTT1<sub>null</sub>* and DNA repair *XRCC1<sub>194Trp</sub>* and *OGG1<sub>326Cys</sub>* could modify individual susceptibility to adverse coal exposure effects caused by the exposition to coal mining residues considering the Micronucleus formation (MN) and Comet Assay parameters (Damage Index (DI), Damage Frequency (DF) and Tail % DNA) as endpoints for mutagenicity and genotoxicity. The study population comprised 100 open-cast coal mining workers occupationally exposed to coal residues and 100 non-exposed controls. The study was conducted in the coal mining area of “El Cerrejón”, the world’s largest open-cast coal mine, located in Guajira North Colombia. The analysis of Comet assay values indicated a significant increase in the DI, DF and Tail % DNA ( $p < 0.001$ ) in the exposed group in comparison to the non-exposed control group. There was also a significant MN frequency increase in exposed workers, represented by a relative risk (RR) of almost the triple (2.88, 95% CI 2.525 – 3.284,  $p < 0.001$ ) for the exposed population, representing a higher risk in relation to the matched non-exposed control. Despite of this, the results show that polymorphisms in the metabolism genes (*CYP1A1<sub>Msp1</sub>*, *GSTM1<sub>null</sub>*, *GSTT1<sub>null</sub>*) and DNA repair genes (*XRCC1<sub>194Trp</sub>* and *OGG1<sub>326Cys</sub>*) had no impact on MN frequencies in peripheral lymphocytes of exposed workers. Similarly, polymorphisms in metabolism genes (*CYP1A1<sub>Msp1</sub>*, *GSTM1<sub>null</sub>*, *GSTT1<sub>null</sub>*) did not influence levels of DNA damage detected by comet assay.

The XRCC1<sub>194Trp</sub>/- genotype shows a protective effect evidenced by a decreased MN frequency in exposed individuals, although with no statistical significance.

To our knowledge, this study provides the first data in the country on a genotoxic hazard associated to exposure to coal residues by mining activities and contributes to establishing a general map of representative genotype frequencies in the Latin-American population, which is quite complex given the high degree of ethnic admixture and stratification.

# **INTRODUÇÃO**

## 1. O CARVÃO

O carvão mineral de origem fóssil foi uma das primeiras fontes de energia utilizadas em larga escala pelo ser humano. É formado pela decomposição da matéria orgânica (como restos de árvores e plantas) durante milhões de anos, sob determinadas condições de temperatura e pressão (ANEEL, 2007).

O carvão, assim como todos os combustíveis fósseis, é uma complexa e variada mistura de componentes orgânicos sólidos, fossilizados ao longo de milhões de anos. Composto por átomos de carbono, oxigênio, nitrogênio, enxofre, associados a outros elementos rochosos (como arenito, siltito, folhelhos e diamictitos) e minerais, como a pirita, tem uma estrutura muito complexa, sendo uma das maiores fontes naturais de hidrocarbonetos. Sua qualidade, determinada pelo conteúdo de carbono, varia de acordo com o tipo e o estágio dos componentes orgânicos (León et al., 2007).

Atualmente, a principal aplicação do carvão mineral no mundo é a geração de energia elétrica por meio de usinas termelétricas. Em segundo lugar aparece a aplicação industrial para a geração de calor (energia térmica), necessária aos processos de produções tais como secagem de produtos, cerâmicas e fabricação de vidros. Um desdobramento natural dessa atividade e que também tem se expandido é a cogeração ou utilização do vapor aplicado no processo industrial também para a produção de energia elétrica.

De acordo com dados da International Energy Agency (IEA), o carvão é a fonte mais utilizada para geração de energia elétrica no mundo, respondendo por 41% da produção total. Sua participação na produção global de energia primária, que considera outros usos além da produção de energia elétrica, é de 26%. A IEA também faz a projeção de que o minério manterá posição semelhante nos próximos 30 anos (UPME, 2005).

A mineração de carvão é uma das atividades de exploração com maior capacidade de poluir, sendo o maior poluente dentre os combustíveis (Zahrewski, 1991). A principal restrição à utilização do carvão é o forte impacto socioambiental provocado em todas as etapas do processo de produção e também no consumo. A extração, por exemplo, provoca a

degradação das áreas de mineração e a combustão é responsável por emissões de gás carbônico (CO<sub>2</sub>) (ANEEL, 2007).

## **1.1 O carvão na Colômbia**

### **1.1.1 Reservas**

A Colômbia possui as maiores reservas de carvão da América Latina. Os potenciais de recursos são de aproximadamente 16.992 Milhões de toneladas (Mt), o que a faz o sexto exportador mundial do carvão do mundo, com uma participação do 6,3%, equivalente a 50 mt de carvão anuais (UPME, 2005).

A produção de carvão concentra 47% da atividade de mineração do país e representa 1% do produto interno bruto colombiano, gerando cerca de 3,4 bilhões de pesos. Nos últimos anos tem se consolidado como o segundo maior produto de exportação, após o petróleo.

A maior parte das reservas está localizada na Costa Atlântica, e compreende 90% do carvão térmico que, por sua vez, corresponde a 98% do carvão nacional. 95% das reservas estão localizadas nos Departamentos de Guajira, Cesar, Córdoba, Norte de Santander, Cundinamarca, Boyacá, Antioquia, Valle del Cauca e Cauca.

### **1.1.2 Produção**

As jazidas de carvão da Costa Atlântica estão caracterizadas por sistemas de mineração a céu aberto, onde é encontrada a maioria dos 25 mil trabalhadores do setor minero do país.

A mina de “El Cerrejón”, a maior mina de carvão a céu aberto do mundo, está localizada no Departamento de Guajira, ao Norte da Colômbia. A jazida conta com recursos estimados em 2.193 milhões de toneladas de carvão, estendendo-se por 69 mil hectares, dentro dos quais existem cinco áreas: Zona Norte, Patilla, Oreganal, Zona Central e Zona Sul.

A mineração de carvão a céu aberto é uma operação em sequência que se inicia com a limpeza da superfície e a retirada cuidadosa da capa vegetal até que as jazidas de carvão sejam expostas. O carvão extraído é logo transportado em caminhões da mina até os lugares de armazenamento e trituração, para então serem levados aos silos de carregamento dos trens.

### 1.1.3 Composição do carvão do Cerrejón

O carvão do Cerrejón é de tipo betuminoso, com um alto poder calorífico, baixo teor de cinzas e relativamente baixa concentração de elementos-traço. Algumas características físicas descritas para o carvão extraído na mina descrevem um conteúdo de voláteis (~30%), umidade (~10%), cinzas (~8%), enxofre (~1%), carbono (~70%), hidrogênio (~6%), oxigênio (~5%), nitrogênio (~1%), assim como outros metais (Irons et al., 2000)

A abundância dos diferentes elementos minerais no carvão do Cerrejón, determinada por Microscopia Eletrônica de Varredura Controlada por Computador (CCSEM), mostram que mais de 80% do peso do material mineral é composto de minerais de argila e quartzo (Silicato de Alumínio (*Alsil*), Silicato de alumínio e sílica (*Si-alsil*) e Sílica (*Si*) (Irons et al., 2000). A análise do produto da combustão revela que as cinzas são formadas principalmente de silicatos de alumínio, óxido de ferro e partículas de quartzo.

A produção deste tipo de carvão com altos teores de sílica tem sido relacionada com altos níveis de poluição na água potável das comunidades perto da mina, algumas doenças e sintomas como dores de cabeça, erupções cutâneas e doenças do pulmão (Adamsen et al., 2010).

## 1.2 Efeitos genotóxicos da mineração de carvão

Os efeitos da exploração de carvão sobre os sistemas biológicos e o DNA têm sido referenciados por numerosas investigações ao redor do mundo (Celik et al., 2007; da Silva et

al., 2000; Donbak et al., 2005; José Zocche et al., 2010; Tarantini et al., 2011b), contudo, a maioria destas observações tem sido geradas em estudos feitos em minas de carvão subterrâneas, permitindo que os efeitos gerados em outros tipos de mineração fiquem desconhecidos. Em alguns estudos realizados em trabalhadores de minas de carvão a céu aberto e em trabalhadores de usinas elétricas que usam o carvão como fonte de energia, foi demonstrado um aumento no índice de aberrações cromossômicas em linfócitos do sangue periférico (Ulker et al., 2008).

Outros estudos incluem os resultados obtidos por Celik (2007) que avaliou a carcinogenicidade das emissões de plantas e minas de carvão em trabalhadores; Zocche et al. (2010), que estudaram os efeitos genotóxicos da exploração de carvão sobre três espécies de morcegos; e León et al. (2007), que demonstraram os efeitos genotóxicos dos resíduos da exploração sobre duas espécies de roedores em minas a céu aberto. Como estes muitos outros estudos têm demonstrado o efeito tóxico do carvão e seus derivados sobre diversas linhagens e tipos celulares (Li et al., 2011).

Apesar disso, o carvão mineral e alguns dos produtos de sua extração, como o pó de carvão continuam sendo classificados como não carcinogênicos para humanos (Grupo 3) pela *Agência Internacional para a Investigação do Câncer (IARC)*.

Na mineração de carvão a céu aberto, é gerada uma grande quantidade de partículas de pó, Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (HAPs) e metais pesados. Nos processos de exploração de carvão, grande parte das substâncias é liberada na atmosfera, onde formam misturas complexas, um dos maiores riscos ocupacionais para a saúde e segurança dos trabalhadores, se for considerado que a exposição a uma combinação de compostos pode ser mais perigosa pelos efeitos sinérgicos, aditivos e potencializadores da mistura resultante.

Alguns dos elementos gerados durante as atividades de extração de carvão e que aparecem associados com problemas de toxicidade incluem alguns metais pesados, que ocorrem em altas concentrações no carvão, como o Cobre (Cu), Chumbo (Pb), Cádmio (Cd), Níquel (Ni), Vanádio (V), Zinco (Zn) e Enxofre (S), também presentes na combustão deste mineral (ATSDR, 1993).

A combustão espontânea do carvão, que é causada pelo contato com a luz do sol, é bastante comum nos centros de armazenamento dos sistemas de mineração a céu aberto, e é considerada como uma das principais fontes na geração de HAPs nas minas (Peralba, 1990). Os HAPs formam-se quando o material orgânico, constituído por carbono e hidrogênio, é submetido a processos de combustão espontânea incompleta. Os HAPs são comuns em matrizes complexas, incluindo o petróleo, o petróleo destilado, fumo, efluentes de uma grande variedade de atividades industriais (produção de coque, fumo de cigarro, fundição de metais) e processos de queima de carvão. Muitos HAPs, particularmente aqueles compostos por cinco e seis anéis que podem ser metabolizados a diol epóxidos, são mutágenos e carcinógenos animais (White, 2002a). Além disso, seu metabolismo *in vivo* pode resultar na produção de metabólitos electrofílicos que ligam se de forma covalente ao DNA, formando adutos com as purinas depois de sua ativação metabólica, que envolve o complexo enzimático P450 (Pastor, 2002), e têm sido associados com um aumento no risco de câncer de mama (Gammon and Santella, 2008), pulmão, pele e bexiga (Mastrangelo, 1996).

Além da toxicidade do componente químico, outros elementos tóxicos do carvão podem se originar nos processos de extração, processamento ou manipulação. No processo de trituração do carvão, podem ser produzidas enormes quantidades de partículas de pó e material particulado na forma de pó fugitivo. A inalação contínua deste material particulado é uma importante fonte celular e não celular de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) no pulmão, e podem, portanto, estar envolvidas no dano de células alvo deste tecido, de outros tipos celulares e de importantes macromoléculas como o DNA (Schins and Borm, 1999).

## **2. EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR**

A epidemiologia molecular é uma área relativamente nova de pesquisa que combina biomarcadores genéticos e ferramentas de epidemiologia clássica (histórias clínicas e questionários). Esta nova área contrapõe valores de dose interna, dose biologicamente



efetiva, efeitos biológicos e influência da suscetibilidade individual, com metodologias epidemiológicas.

O termo biomarcador ou marcador biológico é definido como um fato que se produz em um sistema biológico, como o corpo humano, por exemplo, e que pode ser medido. No campo da saúde, os biomarcadores são frequentemente usados como indicadores do estado de saúde ou de risco de doença. Embora alguns dos biomarcadores sejam de difícil classificação, eles são, geralmente, divididos em biomarcadores de exposição, biomarcadores de efeito e biomarcadores de suscetibilidade (Repetto and Kuhn Repetto, 2009).

### **2.1 Biomarcadores de exposição**

Os biomarcadores de exposição podem ser compostos exógenos (ou metabólitos) que são introduzidos no corpo, um produto interativo entre o composto (ou metabólito) e um componente endógeno, ou qualquer outro fato relacionado com a exposição (Grandjean, 1995). O mais comum é que os biomarcadores de exposição incluam medições das concentrações do metabólito em amostras como o sangue ou a urina.

O teste Cometa (também conhecido como ensaio em gel de células individuais) tem sido utilizado como um marcador de exposição importante. É uma técnica rápida, simples e sensível para a medição das quebras simples no DNA dentro de células individuais de mamíferos. O método combina a simplicidade de técnicas para detectar o dano no DNA (quebras simples e duplas, sítios alcali-lábies, sítios de reparação por excisão incompleta) com as análises de células individuais típicas em ensaios citogenéticos (Lynch et al., 2011).

O teste pode também avaliar a capacidade individual de reparo, quando analisado em momentos diferentes após a exposição (até 24 horas e após esse período) e comparando os resultados destes períodos (Villela I et al., 2003).

## 2.2 Biomarcadores de efeito

Os biomarcadores de efeito são parâmetros bioquímicos, fisiológicos, comportamentais e outras medidas de alterações no organismo, que refletem a interação da substância química com os receptores biológicos. Alterações nestes biomarcadores representam risco para o desenvolvimento de algumas doenças. Os mais utilizados são as medidas de dano de DNA, tais como alteração de bases, formação adutos, aberrações cromossômicas (AC), troca de cromátides irmãs (TCI) e micronúcleos (MN) (Rohr, 2008).

O teste de Micronúcleos e outras anomalias nucleares são biomarcadores de eventos genotóxicos, instabilidade cromossômica e mutagenicidade. Estes tipos de anomalias são comumente encontrados em diferentes tipos de câncer e são indicativos de dano no genoma. Os MN podem ser originados durante a anáfase pela migração errada de cromossomas acêntricos ou fragmentos de cromátides causados pela reparação errada de quebras no DNA. A segregação errada de cromossomos inteiros durante a anáfase podem também levar à formação de MN como resultado da hipometilação de sequências repetidas no DNA centromérico ou pericentromérico, defeitos na montagem ou nas proteínas do cinetócoro, fuso mitótico disfuncional e defeitos nos genes de checkpoint na anáfase (Fenech et al., 2011). A presença de uma elevada frequência de MN em linfócitos circulantes é geralmente indicativa de um aumento no risco de câncer para os indivíduos expostos a um agente danoso do DNA (Bonassi et al., 2006).

## 2.3 Biomarcadores de suscetibilidade

Um marcador de susceptibilidade, seja herdada ou induzida, é um indicador de que um indivíduo é especialmente sensível ao efeito de um xenobiótico ou aos efeitos de um grupo de xenobióticos. A capacidade de metabolizar determinadas substâncias químicas é variável e está determinada geneticamente. A suscetibilidade individual aos efeitos dos

xenobióticos é modulada por diferenças na capacidade de metabolização e também pela eficiência nos diferentes sistemas de reparação de DNA (Rohr, 2008).

### 2.3.1 Genes do metabolismo

Para combater a toxicidade, evolutivamente, o organismo desenvolveu formas de eliminar e impedir o acúmulo de xenobióticos. Isto é conseguido principalmente por meio de enzimas de biotransformação, que reconhecem e convertem os xenobióticos em formas solúveis em água facilmente eliminadas do organismo.

O metabolismo de xenobióticos é dividido em duas fases distintas. Ao entrar na célula, as substâncias são inicialmente metabolizadas pelas enzimas de fase I, geralmente, por uma reação de oxidação que introduz um centro electrofílico na molécula. A criação do centro reativo permite que as enzimas de fase II conjugem o metabólito eletrofílico com várias moléculas endógenas (por exemplo, glutathione) que resulta num metabólito final hidrofílico que, em populações humanas, é eliminado do organismo através da urina ou do bolo fecal. Em muitas situações a toxicidade do xenobiótico é reduzida ou eliminada durante a fase de metabolização. Contudo, em alguns casos a toxicidade aumenta. Isto ocorre especialmente após a reação de fase I.

A atividade das enzimas de fase I e de fase II é controlada no tempo e no espaço para assegurar que os metabólitos reativos e potencialmente danosos sejam eliminados do organismo. Assim, mutações polimórficas nos genes que codificam as enzimas de biotransformação resultam em fenótipos com maior ou menor capacidade de metabolização e de detoxificação de xenobióticos potencialmente tóxicos ao organismo (de Abreu Gaspar et al., 2003).

A grande maioria dos estudos feitos com genes de susceptibilidade envolve os genes de fase I da superfamília Citocromo P450 (CYP450) e os genes de fase II da superfamília Glutathione S-transferase (GST). Alguns polimorfismos destes genes (*GSTM1<sub>nulo</sub>* – *GSTT1<sub>nulo</sub>* e *CYP1A1<sub>Msp1</sub>*) têm sido identificados por sua influência na aparição de certos tipos de câncer (Marcon et al., 2003), assim como por sua influência sobre os níveis de dano

registrados com técnicas como o ensaio cometa, o teste de micronúcleos (Pavanello et al., 2005) e a geração de dano oxidativo e cromossômico (Salama et al., 2001), embora a maioria dos resultados ainda sejam considerados conflitantes (Tabela 1). Uma metanálise realizado por Kirsch-Volders et al. (2006) revelou que somente dois de oito estudos sobre a influência dos polimorfismos em genes das GST sobre as frequências de MN apresentaram diferenças significantes, e unicamente para o GSTM1. A este respeito, Mateuca et al. (2005) demonstraram que um aumento na frequência de MN não depende na maioria dos casos dos polimorfismos em genes do metabolismo de xenobióticos.

Entre as enzimas de fase I, ou de Ativação, o gene *CYP1A1* codifica a enzima Aril Hidrocarboneto Hidroxilase (AHH), que tem atividade oxidativa e que está associada com a ativação de pro-carcinógenos. Os HAP são um dos principais substratos para a enzima; a presença de HAP em células e tecidos alvo produz um aumento nos níveis da enzima, a rápida oxidação dos hidrocarbonetos e a geração de alguns metabólitos altamente reativos (Indulski and Lutz, 2000). Dentro dos vários polimorfismos para o *CYP1A1*, alguns têm sido estreitamente envolvidos com o risco de câncer. O polimorfismo *Msp1* na região 3' (T6235) do gene, resulta em uma enzima altamente reativa, com uma elevada atividade oxidativa que gera uma maior produção de metabólitos reativos (Smith et al., 2001) associados ao dano no DNA e a formação de adutos. Este polimorfismo tem sido relacionado com câncer de pulmão (Zhan et al., 2010), cólon (Pande et al., 2008), câncer de mama (Shen et al., 2006) e de esôfago (Zhuo et al., 2009).

Portadores da mutação na AHH apresentam além de altos níveis de adutos DNA-HAPs, mutações no gene p53. Assim, o risco destes desenvolverem câncer de pulmão é sete vezes mais elevado do que nos portadores homocigóticos do fragmento selvagem (Kawajiri et al., 1990).

As Glutathione S-Transferases (GST) são parte importante no sistema de detoxificação celular e estão envolvidas nos processos de proteção contra metabólitos reativos de oxigênio (Landi, 2000). Estas enzimas da fase II atuam na conjugação dos metabólitos com um substrato endógeno, por enzimas transferases. O resultado deste processo é a

transformação dos metabólitos em substâncias hidrofílicas, e assim, passíveis de excreção (Rohr, 2008).

Grande parte das informações existentes sobre os efeitos dos polimorfismos de GST na susceptibilidade individual a carcinógenos químicos relaciona-se com as isoenzimas *GSTM1* e *GSTT1*; este grupo de enzimas participa no metabolismo de uma ampla faixa de carcinógenos (Indulski and Lutz, 2000), e constituem uma das principais rotas do metabolismo das ERO (Marcon et al., 2003)

Os genes *GSTM1* e *GSTT1* mostram uma elevada variabilidade em humanos. Cerca de 50% da população caucasiana apresenta um genótipo nulo (sem atividade enzimática) para o gene *GSTM1* (Board, 1981) enquanto que 25%-40% apresenta nulidade para o gene *GSTT1* (Pemble et al., 1994). Este fenótipo nulo é produto de uma deleção em ambos os alelos. Estudos na América Latina, em populações do Brasil demonstraram frequências de 33% (Grégio D'Arce and Cólus, 2000) e de 41,2% (Cabral et al., 1999) para o genótipo *GSTM1* nulo.

**TABELA 1.** Resultados conflitantes dos polimorfismos de metabolismo de xenobióticos e MN em linfócitos de sangue periférico dependendo da exposição ocupacional.

GENE	POLIMORFISMO	N	EXPOSIÇÃO	RESULTADO	SIGNIFICÂNCIA ( <i>P-value</i> )	REFERÊNCIAS
<b>GSTM1</b>	<b>Nulo</b>	151	Formaldeído	Sem associação	NS	(Jiang et al., 2010))
		402	Cloreto de vinil	Sem associação	NS	(Ji, Wang et al. 2010)
		159	Petroleiro Prestige	Sem associação	NS	(Pérez-Cadahía, Laffon et al. 2008)
		343	Agentes genotóxicos	Sem associação	NS	(Kirsch- Volders et al., 2006)
		66	Áreas Industriais	Sem associação	NS	(Ishikawa et al., 2003)
		80	Abestos	↑MN no genótipo nulo	0, 069	(Neri et al., 2005)
		108	Pesticidas	Sem associação	NS	(Rohr, da Silva et al. 2010)
		134	Tráfego	↑MN no genótipo nulo	0,02	(Leopardi, Zijno et al. 2003)
<b>GSTT1</b>	<b>Nulo</b>	151	Formaldeído	Sem associação	NS	(Jiang, Yu et al. 2010)
		402	Cloreto de vinil	Sem associação	NS	(Ji, Wang et al. 2010)
		159	Petroleiro Prestige	Sem associação	NS	(Pérez-Cadahía, Laffon et al. 2008)
		343	Agentes genotóxicos	Sem associação	NS	(Kirsch- Volders et al., 2006)
		58	Lixo eletrônico	↑MN no genótipo nulo	0, 013	(Chen 2010)
		108	Pesticidas	Sem associação	NS	(Rohr, da Silva et al. 2010)
		95	Estireno	↑MN no genótipo nulo	< 0, 05	(Migliore 2006)
		166	Fornos de carvão	Sem associação	NS	(Qiu, Leng et al. 2007)
<b>CYP1A1</b>	<b>Msp1</b>	108	Pesticidas	Sem associação	NS	(Rohr, da Silva et al. 2010)
		159	Petroleiro Prestige	Sem associação	NS	(Pérez-Cadahía, Laffon et al. 2008)
		66	Áreas Industriais	Sem associação	NS	(Ishikawa, Ishikawa et al. 2006)
		166	Fornos de carvão	Sem associação	NS	(Qiu, Leng et al. 2007)
		134	Tráfego	Sem associação	NS	(Leopardi, Zijno et al. 2003)

Adaptado de Dhillon et al., (2011) NS: Não significativa

Indivíduos com *GSTM1*<sub>nulo</sub> e *GSTT1*<sub>nulo</sub> não podem conjugar metabólitos específicos para estas enzimas. Por esta razão, são suscetíveis a danos oxidativos e, eventualmente, outras condições relacionadas, como algumas doenças pulmonares. Wang et al. (2010c) e Pinarbasi et al. (2003) encontraram uma forte associação entre o genótipo nulo para *GSTM1* e a susceptibilidade ao câncer de pulmão.

Ser portador do fragmento *MspI* mutado do *CYP1A1* e conseqüentemente do genótipo *GSTM1*<sub>nulo</sub> pode contribuir no aumento da incidência de certos tipos de câncer (Dialyna et al., 2003).

### 2.3.2 Genes de Reparação do DNA

Polimorfismos em genes de reparação de DNA podem representar fatores de suscetibilidade que afetam a integridade do DNA, aumentando o risco de alguns tipos de câncer em humanos (Zijno et al., 2006).

A reparação de DNA é essencial na proteção do genoma celular de agressões do ambiente (De Ruyck et al., 2007), e vários estudos têm demonstrado que uma reduzida capacidade na reparação de DNA está associada com um aumento no risco de câncer de pulmão (Decordier et al., 2010; Shen et al., 2003).

Muitos genes de reparação de DNA têm polimorfismos genéticos, com o potencial de modular a função gênica e alterar a capacidade de reparação do DNA (Xi et al., 2004).

Entre as vias de reparação de DNA que operam sobre tipos específicos de dano em humanos, são encontradas as vias de Reparação por Excisão de Bases (BER), que removem pequenas lesões no DNA, como bases reduzidas ou oxidadas e quebras de fita simples, Reparação por Excisão de Nucleotídeos (NER), que está envolvida na reparação de adutos no DNA de tipo bulky, cross-link e danos oxidativos (De Ruyck et al., 2007), reparação por reversão do dano *in situ*, que acontece na reparação das lesões induzidas por radiações, Reparação de Emparelhamento Incorreto de Bases (Mismatch Repair ou MMR), que corrige

erros de replicação, e a reparação de quebras de dupla fita (Recombinação Homóloga e Recombinação Não - Homóloga) (Saffi and Henriques, 2003)

As enzimas de reparo *XRCC1* (*X-Ray Repair Cross-Complementing Protein*) e *OGG1* (*8-Oxoguanine DNA Glycosylase*) têm um importante papel na via BER (Vidal et al., 2001).

### **2.3.2.1 A proteína de reparação XRCC1 (X-Ray Repair Cross-Complementing Protein)**

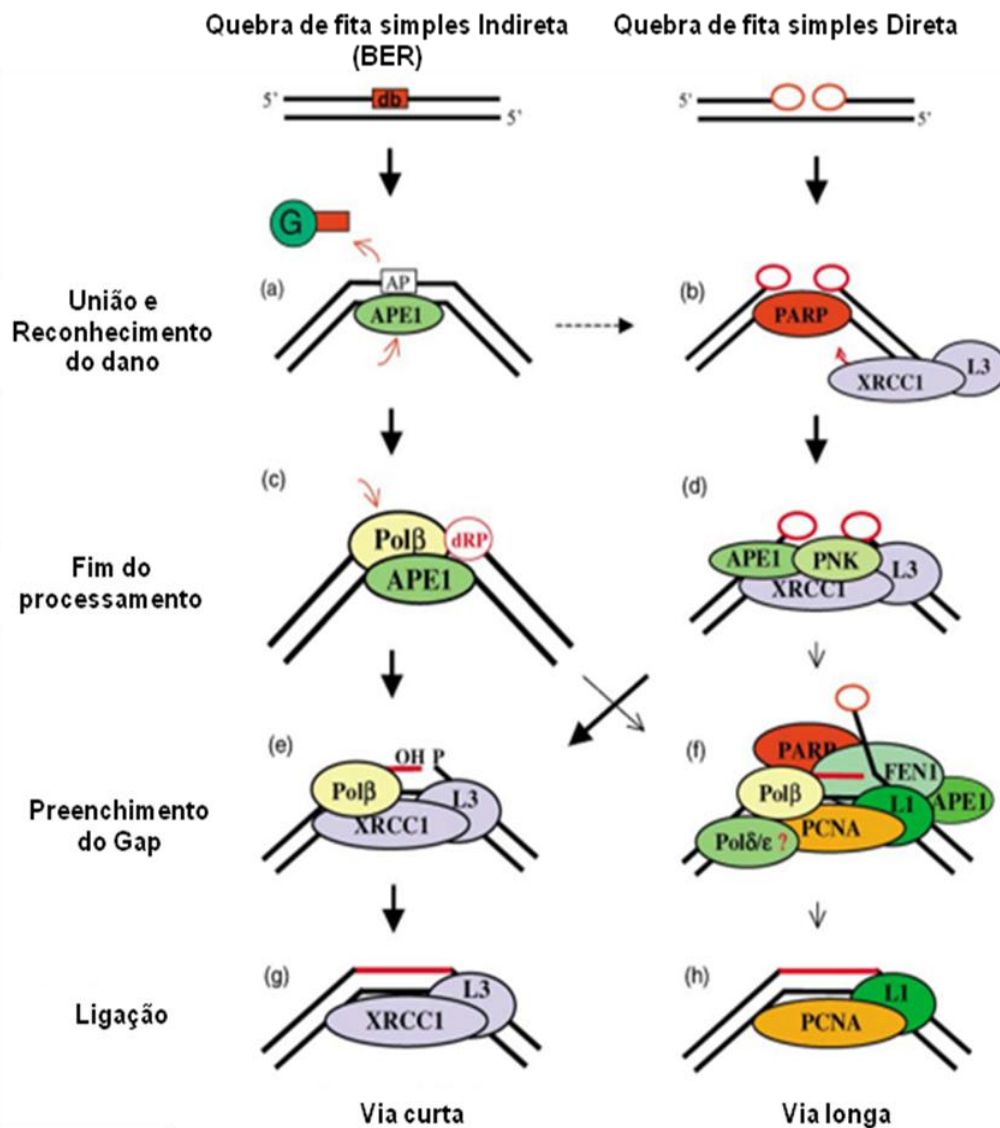
A proteína XRCC1 tem uma função importante no reparo de quebras de fita simples em células de mamíferos, por possuir a capacidade de interagir com múltiplos componentes enzimáticos nas reações de reparação. De fato, embora não apresente atividade enzimática, o XRCC1 interage com componentes enzimáticos em cada etapa da reparação de quebras simples (Figura 1).

Dentro da via BER é proposto que XRCC1 interaja com PARP e a DNA ligase III no reconhecimento e união de quebras de fita simples (Caldecott et al. 1996) e que no complexo ternário de DNA-XRCC1-Pol $\beta$  atue como uma “proteína ancora” (Huang et al., 2009). Mutantes XRCC1 têm uma alta sensibilidade na resposta a agentes alquilantes e radiação ionizante, apresentando elevados níveis de troca de cromátides irmãs em células de ovário de hamster chinês (Thompson and West, 2000).

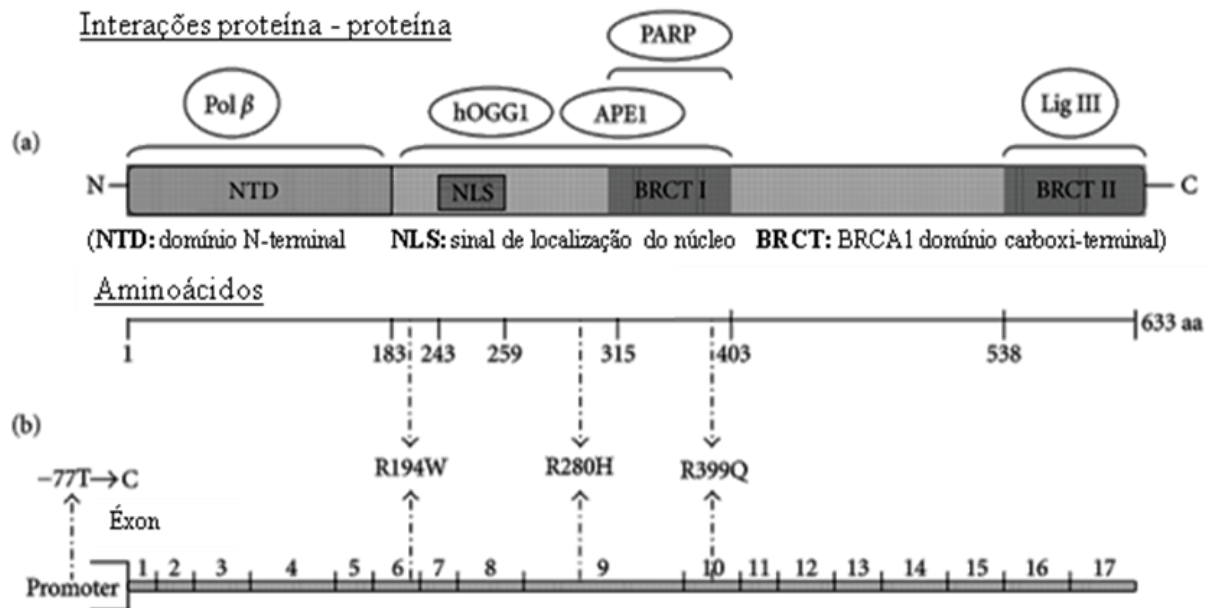
Estes tipos de alterações poderiam estar associados com um aumento no risco de alguns tipos de câncer (De Ruyck et al., 2005; Ratnasinghe et al., 2003; Tuimala et al., 2002; Wang et al., 2009). Em 1998, Shen et al. argumentaram que na fita do gene de XRCC1, três mutantes pontuais, *Arg194Trp*, *Arg280His* e *Arg399Gln*, eram variantes de substituições de aminoácidos (Shen et al., 1998). *Arg194Trp* e *Arg280His* encontram-se entre os domínios de união da Pol $\beta$  e PARP, enquanto *Arg399Gln* localiza-se na proximidade do domínio de união da PARP (Figura 2).

A maior parte dos artigos publicados sobre o polimorfismo *Arg194Trp* relataram uma redução no risco de câncer na presença do alelo mutado (Moullan et al., 2003; Ratnasinghe et al., 2001; Stern et al., 2001).





**Figura 1. Modelo de reparação de quebras de fita simples de DNA mediado pelo BER.** Nas quebras indiretas geradas durante BER, uma base danificada no DNA (db) é removida por uma DNA glicosilase (G), que é logo deslocada do sítio abásico (AP) pela APE1 (a) que então recruta à Polβ e cliva o sítio abásico (c). Pol β insere um único nucleotídeo e repara o extremo 5-desoxirribose, fosfato (DRP) criado pela APE1 (e). Isso resulta em um nick ou corte que é selado pelo recrutamento do complexo XRCC1-Lig3α (g). Em algumas circunstâncias a Polβ não pode remover o extremo 5-dRP (ex: se o dRP é oxidado ou reduzido). Nestes eventos de reparo “bloqueado”, o recrutamento da PARP, PCNA e FEN1 estimula a extensão da lacuna por 2-45 nucleotídeos e cliva o retallo resultante (f). O nick é então ligado pela Lig1 (h). Em algumas circunstâncias a Polβ pode participar na via longa de reparo. (b) As quebras de cadeia simples (SSB) geradas diretamente por danos no açúcar e possivelmente um subconjunto de SSBs gerados durante BER (sítios abásicos que são “desengatados” da APE1 ou que são clivados pela AP liase (seta pontilhada) são ligadas pela PARP-1 ou PARP-2, as quais são logo ativadas e auto-modificadas. As PARP auto-modificadas recrutam o complexo XRCC1-Lig3α formando um andaime molecular. (d) Os extremos 5’ou 3’danificados (círculos vermelhos) são convertidos em metades 5’fosfato e 3’hidroxil pela APE1 ou PNK, as quais interagem com e são estimuladas pelo XRCC1. O recrutamento da Polβ (e) permite o preenchimento da lacuna com um único nucleotídeo na maioria dos SSBs, seguida da ligação pela Lig3α (g). Em alguns rompimentos diretos, o preenchimento da lacuna pode ser gerada pela via longa pela Polβ ou Polδ/ε (f) com a ligação gerada pela Lig1 (h). Adaptado de Caldecott, (2003).

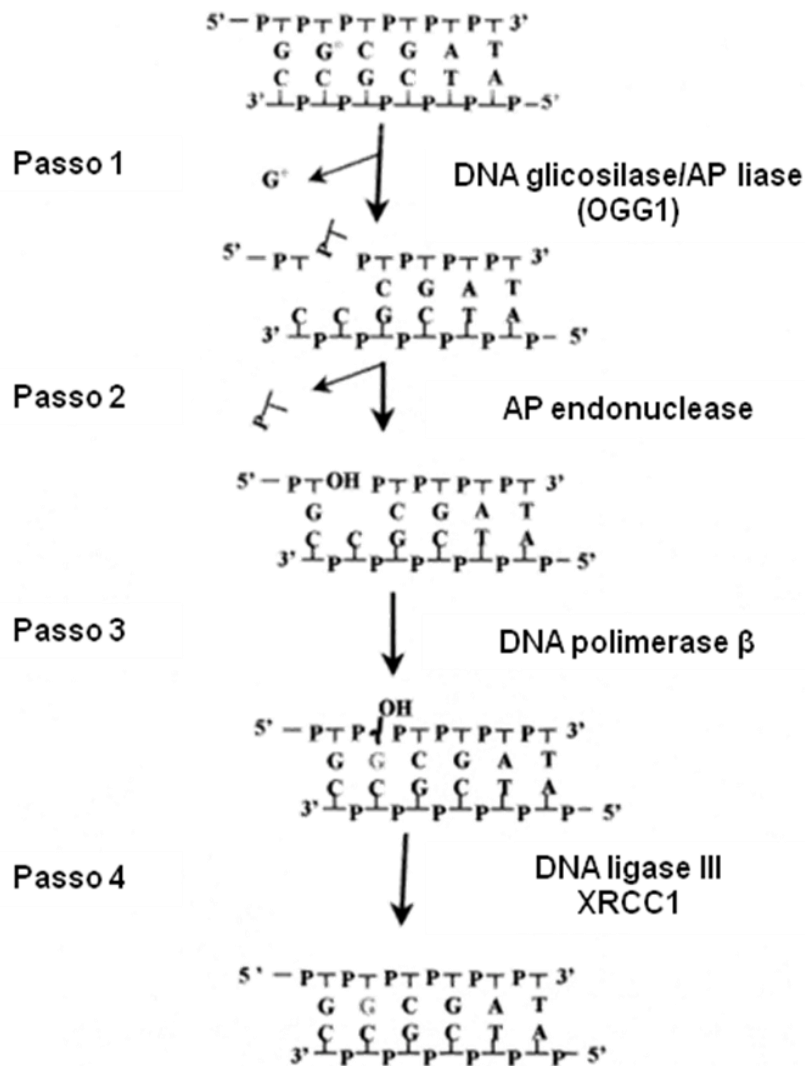


**Figura 2.** Estrutura da proteína e do gene XRCC1 humano. (a) Domínios e regiões de interação com outros componentes da BER. (b) Estrutura do gene com as SNPs mais comuns e estudadas. Adaptado de Sterpone e Cozzi (2010).

### 2.3.2.2 A proteína de reparação OGG1 (8-Oxoguanine DNA Glycosylase)

O produto do gene OGG1 catalisa a excisão da base modificada 8-oxoguanina (8 oxo-G) do DNA que tenha sido danificado pela exposição a espécies reativas do oxigênio na via de reparo BER (Figura 3). OGG1 possui atividade de glicosilase e AP-liase (Klungland and Bjelland, 2007). Durante a replicação 8 oxo-G pode formar um emparelhamento de tipo Hoogsteen com a adenina (8 oxo-G/A), que subsequente durante a replicação produz mutações de tipo G/C → T/A (Kuznetsov et al., 2010).

Uma capacidade de excisão reduzida da base modificada pode levar à acumulação de mutações induzidas pela oxidação (Goode et al., 2002). O gene é localizado no cromossomo 3p25, uma região que frequentemente apresenta perda de heterozigotidade em tumores de pulmão e rim (Chevallard, 1998).



**Figura 3.** Reparação pela via curta de BER da 8-OH-G em células de mamíferos. Primeiro **passo**, uma DNA glicosilase reconhece a base danificada e quebra a ponte N-glicosídica. **Segundo passo**, quebra do sítio AP por uma AP endonuclease para a geração de extremidades 3'OH e 5'P. **Terceiro passo**, incorporação de um nucleotídeo pela DNA polimerase. **Quarto passo**, a fita de DNA é selada pela DNA ligase, restaurando sua configuração inicial, XRCC1 atua como uma proteína suporte trazendo a polimerase e a ligase ao local da reparação. Adaptado de Boiteux and Radicella (2000; 2010).

Vários estudos *in vivo* ou *in vitro* têm avaliado a associação entre os genótipos de OGG1 e a atividade enzimática, embora os resultados tenham sido inconsistentes, como foi demonstrado por Weiss et al. (2005). As análises do reparo de 8-OH-G em extratos de células de mamíferos demonstram que a base é eliminada preferencialmente pela via curta de BER (Fortini et al., 1999). Entretanto, em células deficientes de Pol $\beta$  a eliminação de 8-OH-G pode ser efetuada através da via longa de BER, embora com uma baixa eficiência (Stucki et al., 1998). Uma vez que células derivadas de roedores *Ogg*  $-/-$  não demonstraram nenhuma atividade glicosilase 8-OH-G quando foram medidas usando substratos de oligonucleotídeos, os resultados indicariam que as proteínas *Ogg1* dos mamíferos seriam requeridas para o início da via BER (Klungland, 1999). Alguns dos dados publicados fazem a associação entre o polimorfismo *OGG1*<sub>326Cys</sub> e um aumento no risco de câncer de esôfago, pulmão e próstata (Goode et al., 2002).

No caso dos genes de reparo da via BER, sua influência sobre as frequências de MN em populações expostas a diferentes compostos químicos apresentam resultados conflitantes.

Enquanto para XRCC1, por exemplo, a frequência de MN é significativamente maior em trabalhadores com genótipo CT (*Arg194Trp*) expostos a 1.3 butadieno e cloreto de vinil (Wang et al., 2010a; Wang et al., 2010b). Outros estudos similares não encontraram relação para nenhum dos genótipos do gene e as frequências de MN (Tabela 2). Este mesmo tipo de resultados conflitantes também foi encontrado em frequências avaliadas em trabalhadores de coqueria (Leng et al., 2005; Qiu et al., 2007).

O mesmo tipo de tendência é observado em polimorfismos do *OGG1*. O impacto funcional do polimorfismo *OGG1*<sub>326Cys</sub> tem sido descrito em vários estudos (Chen, 2003; Tarng et al., 2001; Yamane et al., 2004), embora alguns resultados não tenham sido conclusivos (Weiss et al., 2005). Enquanto Mateuca et al. (2008) observaram uma diminuição na frequência de MN em fumantes de grupos de referência com genótipo selvagem *Ser/Ser* *OGG1*<sub>326Cys</sub>, outros estudos têm falhado ao demonstrar este tipo de interação em estudos com diferentes tipos de exposições (Tabela 2).

**TABELA 2.** Resultados conflitantes dos polimorfismos *XRCC1*<sub>194Trp</sub> *OGG1*<sub>326Cys</sub> e MN em linfócitos de sangue periférico dependendo da exposição ocupacional.

GENE	POLIMORFISMO	N	EXPOSIÇÃO	RESULTADO	SIGNIFICÂNCIA ( <i>P-value</i> )	REFERÊNCIAS
<b><i>XRCC1</i></b>	<b><i>Arg194Trp</i></b>	166	BD*	↑MN no genótipo CC	0,015	(Wang et al., 2010b)
		108	Pesticidas	Sem associação	NS	(Rohr et al., 2010)
		166	BD	Sem associação	0,34	(Wang et al., 2010b)
		313	Cloreto de vinil	↑MN no genótipo CT	0,05	(Wang et al., 2010a)
		166	Coque	↑MN no genótipo TT	≤0,05	(Qiu et al., 2007)
		141	Coque	Sem associação	NS	(Leng et al., 2004)
		159	Petroleiro Prestige	Sem associação	NS	(Pérez-Cadahía et al., 2008)
		94	Coque	Sem associação	NS	(Cheng et al., 2009)
		<b><i>OGG1</i></b>	<b><i>Ser326Cys</i></b>	108	Pesticida	Sem associação
313	Cloreto de vinil			↑MN no genótipo CG	0,03	(Wang et al., 2010a)
402	Cloreto de vinil			Sem associação	NS	(Ji et al., 2010)
171	_			Associação	NS	(Mateuca et al., 2008)

\*BD: 1.3 butadieno. Adaptado de Dhillon et al. (2011).

# **O**BJETIVOS

## GERAL

Avaliar a associação entre os polimorfismos dos genes de metabolismo (*GSTM1*, *GSTT1* e *CYP1A1*) e de reparação do DNA (*XRCC1* e *OGG1*) e os efeitos genotóxicos e mutagênicos em uma população ocupacionalmente exposta a resíduos de mineração de carvão na jazida mineira do Cerrejón, Departamento de Guajira – Colômbia.

## ESPECÍFICOS

- Caracterizar os polimorfismos dos genes de metabolismo (*GSTM1<sub>nulo</sub>*, *GSTT1<sub>nulo</sub>* e *CYP1A1<sub>Msp1</sub>*) e de reparação (*XRCC1<sub>194Trp</sub>* e *OGG1<sub>326Cys</sub>*) na população objeto do estudo.
- Estabelecer a associação de polimorfismos dos genes de metabolismo (*GSTM1<sub>nulo</sub>*, *GSTT1<sub>nulo</sub>* e *CYP1A1<sub>Msp1</sub>*) com o dano genotóxico determinado pelo ensaio cometa e o dano mutagênico determinado pelo teste de micronúcleos em indivíduos expostos ocupacionalmente aos resíduos de mineração de carvão e nos indivíduos não expostos.
- Estabelecer a associação de polimorfismos dos genes de reparação de DNA (*XRCC1<sub>194Trp</sub>* e *OGG1<sub>326Cys</sub>*) e o dano mutagênico determinado pelo teste de micronúcleos em indivíduos expostos ocupacionalmente aos resíduos de mineração de carvão e nos indivíduos não expostos.
- Estabelecer a existência de genótipos específicos ou em combinação que constituam um maior risco potencial para os indivíduos em determinadas atividades dentro da cadeia de produção de carvão.

# **CAPÍTULO I**

**LACK OF MODULATION EFFECT OF CYP1A1,  
GSTM1 AND GSTT1 POLYMORPHISMS ON DNA DAMAGE  
RESPONSE TO COAL MINING EXPOSURE.**



**LACK OF MODULATION EFFECT OF *CYP1A1*, *GSTM1* AND *GSTT1* POLYMORPHISMS ON DNA DAMAGE RESPONSE TO COAL MINING EXPOSURE.**

*Lyda Espitia-Pérez*<sup>\*</sup>, *Milton Quintana Sosa*<sup>†</sup>, *Grethel León-Mejía*<sup>\*</sup>, *Luz Stella Hoyos-Giraldo*<sup>‡</sup>, *Juliana da Silva*<sup>§</sup>, *Nubia Yandar*<sup>†</sup>, *João A. P. Henriques*<sup>\*</sup>

<sup>\*</sup> Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>†</sup> Laboratorio de Investigación Biomédica y Biología Molecular, Montería, Córdoba, Colombia.

<sup>‡</sup> Department of Biology, Research Group Genetic Toxicology and Cytogenetics, Faculty of Natural Sciences and Education, Universidad del Cauca, Popayán, Cauca, Colombia.

<sup>§</sup> Curso de Biologia/Curso de Farmácia, Universidade Luterana do Brasil, ULBRA, Canoas, RS, Brazil.

***Corresponding author:***

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

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

**KEYWORDS:**

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

**Submetido à *Toxicology*.**

## ABSTRACT

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

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

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

## INTRODUCTION

In open-cast coal mines, activities such as coal stripping release large amounts of dust into the atmosphere. Coal dust is a tumorigenic agent in experimental animals and was shown to be equivocal tumorigenic agents associated with lymphomas and, at the higher dose, adrenal cortex tumors in rats exposed to either 6.6 or 14.9 mg/m<sup>3</sup> for 6 hours/day intermittently for 86 weeks (NIOSH, 1991). The American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH) considers the toxicity of coal dust with greater than 5 percent silica to be similar to quartz (ACGIH, 1991). The abundance of different mineral chemical types in the El Cerrejon coal, determined by Computer-Controlled Scanning Electron Microscopy (CCSEM) revealed that over 80% by weight of the mineral matter is made up of clay minerals and quartz (Alsil, Si-alsil and Si-rich types (Irons et al., 2000). Exposure to quartz is causally related to silicosis and lung cancer. Statistically significant increases in the incidence of mortality from chronic bronchitis and pulmonary emphysema have been reported after exposure to quartz (Adamis and Williams, 2005). Although quartz and asbestos are the most hazardous minerals to human health identified to date, clay minerals may be dangerous because of their limited solubility in the lung, reactivity, small particle size, and fibrous morphology (Soukup, 2007).

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

Several reports have been published on the adverse effects of coal mine residues on health, like lung cancer and other respiratory disorders (Zhang et al., 2002), and a number of studies have been conducted to provide evidence of genotoxic effects by coal dust residues in occupationally exposed workers (Donbak et al., 2005). However, most of these

studies address exposure to underground coal deposits, while the potential genotoxic effects, generated by open-cast coal mining systems, remain unexplored.

Recently, increased attention has been drawn to genetic polymorphisms in humans which seem to modulate the genotoxic response to environmental and occupational exposures. Genetic susceptibility might be a consequence of variations in genes encoding for carcinogen or xenobiotic-metabolizing enzymes, such as cytochrome P-450 (*CYP*) in Phase I and glutathione S-transferases (*GST*) in Phase II (Garte et al., 2007). *CYP* and *GST* genes play an important role in the detoxification of a wide range of human carcinogens, including several residues as PAHs and particulate matter from coal mining activities (Hosgood et al., 2007). Through metabolism, the complex mixture compounds in coal particulate matter can be bio-transformed into DNA-damaging agents and genetic variations in metabolizing enzymes may influence the response as observed by assessing cytogenetic biomarkers (Sram et al., 2007). The *CYP1A1<sub>Msp1</sub>*, *GSTM1<sub>null</sub>* and *GSTT1<sub>null</sub>* polymorphisms have been linked to an increased activation or to poor detoxification, and have been associated with certain cancers and lung diseases risk (Pavanello et al., 2005). Colombia has one of the world's largest coal reserves and open-cast mine, being the fifth biggest thermal coal exporter world-wide. "El Cerrejón", located northwest of the country, is the biggest open-cast coal mine world-wide, and concentrates most of the mining sector country's workers. In a recent study, we found an increased rate of MN frequency (cytokinesis-blocked Micronucleus assay) and DNA damage (Comet assay) in peripheral lymphocytes of coal workers (León-Mejía et al., 2011). In this scenario, the aim of the present molecular epidemiology (cross-sectional) study was to evaluate if the *CYP1A1<sub>Msp1</sub>*, *GSTM1<sub>null</sub>* and *GSTT1<sub>null</sub>* polymorphisms could have an influence on the individual susceptibility to coal exposure, as demonstrated by MN formation and primary DNA damage in lymphocytes of exposed workers. Our results will contribute to the understanding and discussion of a potential genotoxic hazard resulting from occupational exposure due to open-cast coal mining activities, taking into account biomarkers of genetic polymorphisms regarding metabolizing enzymes. To our knowledge, this study

also provides the first data in the country on a genotoxic hazard associated to exposure to coal residues by open-cast mining activities.

## METHODS

### *Study population and sample collection*

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

### *Blood Samples Collection*

Peripheral blood samples were collected by venipuncture from all 200 participants: 20 mL of blood in heparin tubes (Becton Dickenson, vacutainer), 10 mL for the MN assay and 10

mL for the Comet Assay, and 10 mL of blood were collected in EDTA coated tubes for the DNA isolation and genotyping. Blood sampling was conducted by personnel with medical training at the end of a working period, consisting in a 15-days period of 8 hours inside the mine. All blood samples tubes were coded and kept upright at room temperature in the dark during the transportation (overnight) to the laboratory, where the samples were processed immediately upon arrival. Blood sampling was carried out from June 2009 to January 2010.

#### *Micronucleus Assay*

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

#### *Comet Assay Test*

The alkaline Comet assay was performed as described by Singh *et al.*, (1988) with the modifications suggested by da Silva *et al.*, (2000; 2000) for field work. Thirty microliters of isolated lymphocytes - Histopaque 1077 were mixed with 270 µL 0.5% of low melting

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

Three parameters were evaluated: (i) damage index (DI), in which each cell was designated to one of five classes (from no damage = 0 to maximum damage = 4) according to tail size and shape (Collins, 2004). The values obtained for each individuals could range from 0 (0x100) to 400 (4x100) (ii) damage frequency (DF), calculated as the percentage of damaged cells, and (iii) percentage of DNA in the tail (Tail % DNA). The Tail % DNA gives a clear indication of the appearance of the comets and, in addition is linearly related to the DNA break frequency over a wide range of levels of damage (Hartmann et al., 2003).

#### *DNA isolation and xenobiotic- metabolizing enzymes genetic polymorphisms*

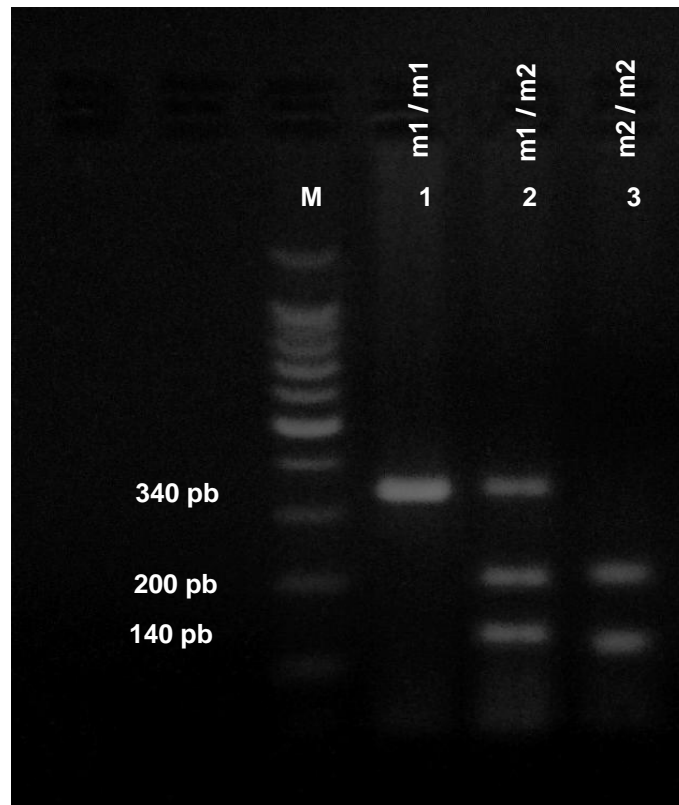
For each 10 mL of blood sample collected in EDTA coated tube, buffy coat containing peripheral blood mononuclear cells (PBMC) was isolated according to the Ficoll–Histopaque method. PBMC were digested with proteinase-K. Genomic DNA was isolated



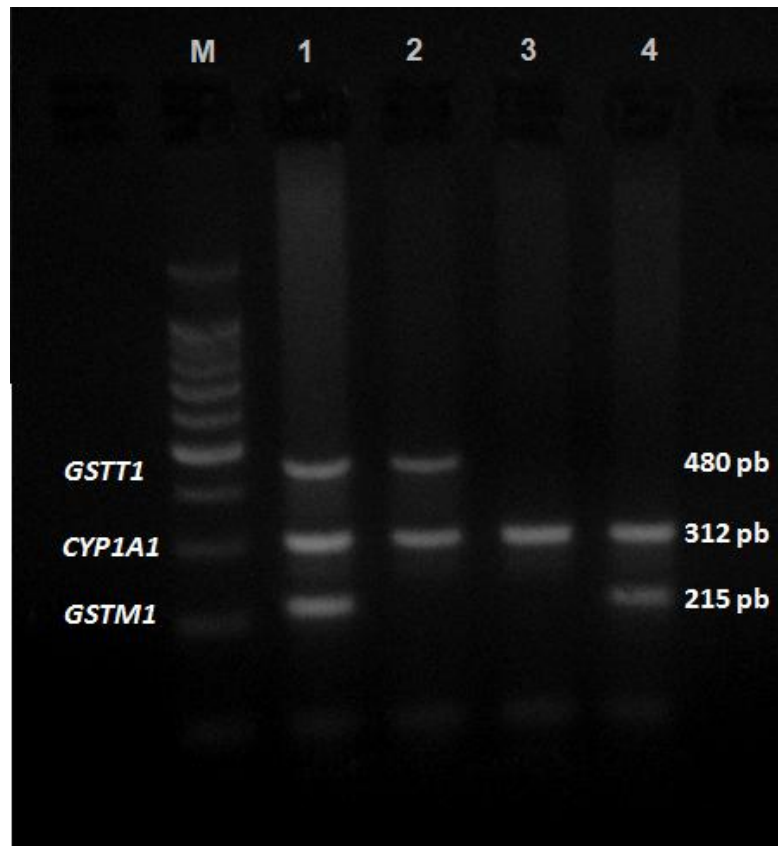
from PBMC by means of commercially available DNeasy Blood and Tissue® extraction kit (Qiagen, USA), according to the manufacturer's instructions. Each DNA sample was stored at -20 °C until analysis.

The *CYP1A1* polymorphism, a T-to-C transition in base pair 264 downstream the poly(A) signal, which creates an *MspI* restriction site (*m2* allele), was identified by Polymerase chain reaction (PCR) and Restriction Fragment Length Analysis (RFLP) techniques according to Lum and Le Marchand (1998). The *CYP1A1* RFLP was carried out using the *MspI* endonuclease, whose restriction site polymorphism resulted in three genotypes: a homozygous *m1* allele without *MspI* site (unique 340 bp fragment), the heterozygote (340, 200 and 140 bp fragments) and a rare homozygous *m2* allele with the *MspI* site (200 and 140 bp fragments), as shown in Figure 4.

The genotyping of *GSTM1* and *GSTT1*, which detects homozygous deleted genes that results in deficiency of the *GSTM1/T1* activity, was carried out by allele-specific multiplex PCR as described earlier by Abdel-Rahman *et al.*, (1996), using *CYP1A1* gene amplification as an internal control. Both PCRs, *CYP1A1* and *GSTM1* and *T1*, were carried out using appropriate primers using approximately 50 ng of DNA. The *GSTM1* and *GSTT1* genotypes were classified as null or positive (at least one undeleted allele). All the resulting bands were separated in agarose gels by electrophoresis and visualized with ethidium bromide staining (10 mg/ml) and ultraviolet transillumination. The presence or absence of *GSTM1* and *GSTT1* genes was detected by the presence or absence of a band at 480 bp (corresponding to *GSTT1*) and a band at 215 bp (corresponding to *GSTM1*). A band at 312 bp (corresponding to *CYP1A1* gene) was always present (Figure 5).



**Figure 4.** PCR-RFLP analysis for the presence/absence of the CYP1A1<sub>MspI</sub> polymorphism: **Lane 1** a homozygous individual (*m1* allele without *MspI* site 340 bp fragment), **Lane 2** heterozygote individual (*m1/m2* 340, 200 and 140 bp fragments) and in **Lane 3** homozygous individual (*m2* allele with the *MspI* site) generates 200 and 140 bp fragments. **M**-Ladder marker



**Figure 5.** Multiplex PCR products for the presence/absence of *GSTM1* and *GSTT1*: **Lane 1:** *GSTM1/T1*<sub>positive</sub>; **Lane 2:** *GSTM1*<sub>null</sub>, *GSTT1*<sub>positive</sub>; **Lane 3:** *GSTM1/T1*<sub>null</sub>; **Lane 4:** *GSTM1*<sub>positive</sub>, *GSTT1*<sub>null</sub>. Band at 312 bp corresponds to the internal control (*CYP1A1* gene fragment). The presence or absence of *GSTM1* and *GSTT1* genes was detected by the presence or absence of a band at 480 bp (corresponding to *GSTT1*) and a band at 215 bp (corresponding to *GSTM1*).

### *Statistical analysis*

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

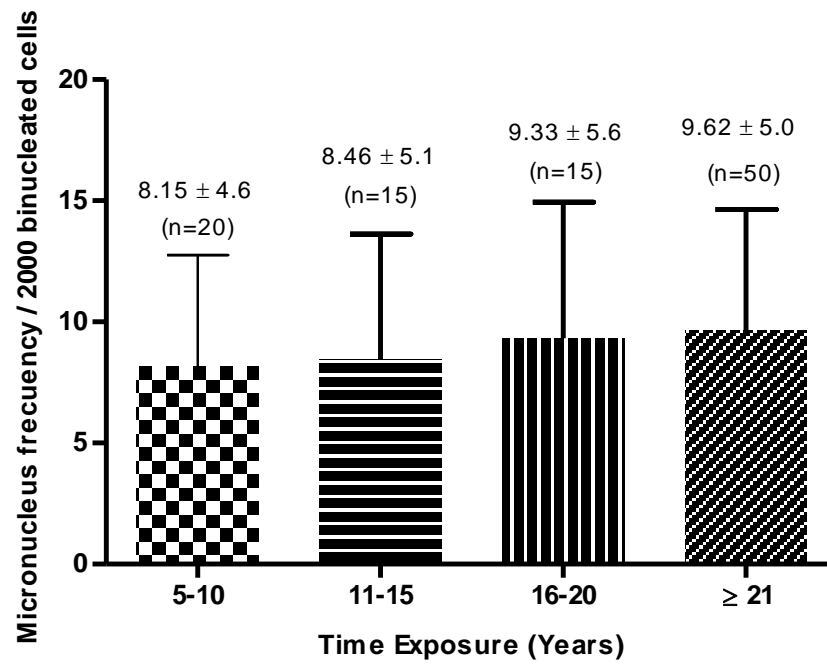
## RESULTS

Despite Spearman correlation coefficients did not reveal a significant association between years of work and MN frequency ( $r = 0.0078$  ( $p = 0.38$ ), a slight exposure-dependent increase only for micronucleus frequency was observed (Figure 6). There was no significant correlation between the time of exposure and Comet assay parameters ( $p > 0.05$ ). No association was found between age and any genotoxic endpoint ( $p > 0.05$ ).

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

The allele/genotype frequencies of *CYP1A1*, *GSTM1* and *GSTT1* studied for the non-exposed control and exposed groups are shown in Table 3. All genotypes were according to the Hardy–Weinberg equilibrium, making selection bias less likely ( $p > 0.05$ ). All variant alleles were in agreement with literature values for Caucasian population (Garte, 2001). The Poisson regression analysis of individual genotypes for the xenobiotic-metabolism genes and relative risk in association with MN frequencies was evaluated in non-exposed controls and exposed individuals (Table 4). The RR was calculated using the wild genotype as reference (lower risk genotype). There was a significant MN frequency increase in exposed workers (RR 2.88, 95% CI 2.525 – 3.284,  $p < 0.001$ ), representing a higher risk in relation to the matched non-exposed control. However, none of the xenobiotic-metabolism genotypes did significantly influence the MN frequency.

The analysis of Comet assay values indicated a significant increase in the Damage Index, Damage Frequency and Tail % DNA ( $p < 0.001$ ) in the exposed group, in comparison to the non-exposed control group (Mann–Whitney U-test) (Table 5). Table 5 also shows the effect of individual genotype on the level of different Comet assay parameters evaluated in non-exposed (control) and exposed groups. No statistically significant effects of *GSTM1* and *GSTT1* variants were obtained in the Comet assay or the MN test for the exposed group.



**Figure 6.** Association of time of exposure to coal mining residues with frequency of Micronucleus in 2000 binucleated cells. Media  $\pm$  SD.

**TABLE 3.** Distribution of *CYP1A1*, *GSTM1* and *GSTT1* genotypes and variant alleles frequencies in non-exposed control and exposed groups.

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

<sup>a</sup>Determined by  $\chi^2$  test

**TABLE 4.** Poisson regression analysis of Micronucleus: Effect of individual genotype in non-exposed control and coal open-cast mining residues exposed groups.

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

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

<sup>b</sup> S.D.: standard deviation

<sup>c</sup> Reference: calculated using the wild genotype as reference (lower risk genotype).

<sup>d</sup> CI: confidence interval

<sup>e</sup> Poisson regression analysis  $p < 0.05$



**TABLE 5.** Effect of individual genotype on Comet assay parameters in non-exposed and coal open-cast mining residues exposed groups (mean and standard deviation).

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

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

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

## DISCUSSION

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

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

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

Considerable evidence has suggested that ROS and their products are involved in the pathogenesis of lung disorders and cancer risk in exposed subjects (Schins and Borm, 1999). Reactive oxygen species (ROS) may be produced by alveolar macrophages and epithelial cells in response to coal and iron dust stimulation by means of the Fenton reaction (Dalal et al., 1995). The excessive production of ROS may increase oxidative stress resulting in DNA damage, lipid peroxidation, protein modification, membrane disruption, and mitochondrial damage (Zhai et al., 2002), all capable of affecting cytogenetic and genetic damage levels. Besides this, quartz appears to be an important genotoxic contaminant in the complex mixtures of fibrogenic respirable airborne particles of

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

Biotransformation plays an important role in the carcinogenic activity of environmental carcinogens. Large inter-individual variation in the biotransformation has been reported, and genetic polymorphisms in some xenobiotic-metabolizing enzymes can in part explain some of these differences. Thus in the present study we evaluated the modulation effect of xenobiotic-metabolizing enzymes polymorphisms *CYP1A1*, *GSTM1* and *GSTT1* on DNA damage response to coal dust exposure. The *CYP1A1* gene encodes for an extra-hepatic enzyme aryl-hydrocarbon hydroxylase, which participates in the activation and detoxification of xenobiotics and various carcinogens, like PAHs and ROS (Kvitko et al., 2000). The *CYP1A1* variant genotype has been found to be associated with higher DNA adducts levels in coke oven workers (Kuljukka-Rabb et al., 2002), and increased Comet assay tail inertias in pot-room workers (Godderis et al., 2006). However, in our study we did not find any relation between *CYP1A1* variants and MN frequencies and DNA damage (Comet assay) increase in the exposed group. Similar MN frequencies results were found in a study that analyzed the two metabolic genotypes *CYP1A1* (*MspI* and *Ile/Val* sites) in coke-oven workers (Brescia et al., 1999), and in other studies that investigated *MspI* polymorphism and risk assessment in other occupational settings (Villarini et al., 2008). Some of the mechanisms that provide protection against oxidative damage by carcinogens in human cells involve detoxification enzymes such as glutathione S-transferase-mu (*GSTM*), and glutathione S-transferase-theta (*GSTT*). Given the importance of *GST* in the

detoxification of electrophilic carcinogens, the null genotypes of both genes have become the object of molecular epidemiology studies because homozygous deletions are expected to result in an impaired ability to detoxify carcinogenic compounds. In our study, the MN frequency and DNA damage (Comet assay) from exposed workers were not influenced by null polymorphisms in these xenobiotic-metabolism genes. In several studies, the null polymorphisms in *M1* and *GSTT1* have been widely studied in relation to genotoxic agents exposure, but the results are still inconsistent and conflicting (Iarmarcovai et al., 2007). Others studies have also failed to demonstrate the association between genotype and DNA damage response due to occupational exposure to coal mining residues (Yucesoy et al., 2005). Besides this, a recent pooled analysis revealed that the influence of *GST* genotypes in MN frequencies was statistically significant only in two of the eight studies and only for *GSTM1* (Kirsch-Volders et al., 2006), which have demonstrated that the MN frequency increase does not depend in most cases of xenobiotic-metabolism or DNA repair genes polymorphisms (Mateuca et al., 2005).

The correlations between age and time of exposure with MN frequency and DNA damage (Comet assay), were not significant for exposed and non-exposed control groups. These results agree with those reported by Grover et al., (2010) and contrarily to previous studies that detected an overall increase in MN frequency with age and gender, being more pronounced in occupationally exposed females as compared with exposed males (Kirsch-Volders et al., 2006). Regarding exposure time in relation to MN frequency and DNA damage levels, several studies have found a relationship between duration of employment and damage levels. This was observed assessing different endpoints, including MN and Comet assay parameters, in other occupational settings (Minozzo et al., 2010). However, data for coal mining occupational time of exposure details are limited and contradictory, which requires more studies in coal exposed populations to provide more insight into occupational hazards resulting from exposure to coal dust.

In this context, larger sample sizes may increase sensitivity of data in further studies, consolidating statistical power in the stratification of the statistical analysis. Similarly, the underlying mechanisms for MN formation may be more reliably elucidated regarding type (whether clastogenic or aneugenic), providing more insight into potential associations

between polymorphisms and MN formation. Also, it would be interesting to include other susceptibility biomarkers in other xenobiotic-metabolizing and DNA repair genes, which should better inform on mechanisms and biological significance of results.

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

#### **ACKNOWLEDGMENTS**

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

## REFERÊNCIAS

- Abdel-Rahman, S. Z., R. A. El-Zein, et al. (1996). "A multiplex PCR procedure for polymorphic analysis of GSTM1 and GSTT1 genes in population studies." Cancer Letters **107**(2): 229-233.
- ACGIH (1991). Documentation of the threshold limit values and biological exposure indices. Documentation of the threshold limit values and biological exposure indices. Cincinnati, OH, American Conference of Governmental Industrial Hygienists. .
- Adamis, Z. n. and R. Williams (2005). Environmental Health Criteria 231 Bentonite, Kaolin and selected clay minerals. W. W. H. Organization. Geneva, WHO World Health Organization. **1**: 175.
- Brescia, G., L. Celotti, et al. (1999). "The influence of cytochrome P450 1A1 and glutathione S-transferase M1 genotypes on biomarker levels in coke-oven workers." Archives of Toxicology **73**(8): 431-439.
- Celik, M., L. Donbak, et al. (2007). "Cytogenetic damage in workers from a coal-fired power plant." Mutat. Res., Genet. Toxicol. Environ. Mutagen. **627**(2): 158-163.
- Collins, A. (2004). "The comet assay for DNA damage and repair." Molecular Biotechnology **26**(3): 249-261.
- da Silva, J., T. R. O. de Freitas, et al. (2000). "Genotoxicity biomonitoring in coal regions using wild rodent *Ctenomys torquatus* by Comet assay and micronucleus test." Environmental and Molecular Mutagenesis **35**(4): 270-278.
- Dalal, N. S., J. Newman, et al. (1995). "Hydroxyl radical generation by coal mine dust: Possible implication to coal workers' pneumoconiosis (CWP)." Free Radical Biology and Medicine **18**(1): 11-20.

- Dobiáš, L., Lehocká, Hana, Závacká, Ivona , Kůsová Jaromira, Adamus Tomas and Tomášková Hana (2006). The Carcinogenic Risk of Occupational Exposure to Quartz Dust: Biomonitoring Results. Environmental Health in Central and Eastern Europe. L. H. Cizmas and A. Tomas, Springer Netherlands. **1**: 111-114.
- Donbak, L., E. Rencuzogullari, et al. (2005). "The genotoxic risk of underground coal miners from Turkey." Mutat. Res., Genet. Toxicol. Environ. Mutagen. **588**(2): 82-87.
- Fenech, M., W. P. Chang, et al. (2003). "HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures." Mutat. Res., Genet. Toxicol. Environ. Mutagen. **534**(1-2): 65-75.
- Garte, S. (2001). "Metabolic Susceptibility Genes As Cancer Risk Factors Time for a Reassessment?" Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **10**: 1233-1237.
- Garte, S., E. Taioli, et al. (2007). "Effects of metabolic genotypes on intermediary biomarkers in subjects exposed to PAHS: Results from the EXPAH study." Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen. **620**(1-2): 7-15.
- Gibson, J. (1979). Coal - an introduction to its formation and properties. . Coal and Modern Coal Processing: An Introduction M. G. Pitt GJ. New York, Academic Press. **2**: 1-25.
- Godderis, L., P. Aka, et al. (2006). "Dose-dependent influence of genetic polymorphisms on DNA damage induced by styrene oxide, ethylene oxide and gamma-radiation." Toxicology **219**(1-3): 220-229.
- Grover, P., P. V. Rekhadevi, et al. (2010). "Genotoxicity evaluation in workers occupationally exposed to lead." International Journal of Hygiene and Environmental Health **213**(2): 99-106.
- Hartmann, A., E. Agurell, et al. (2003). "Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay." Mutagenesis **18**(1): 45-51.

- Hosgood, H. D., S. I. Berndt, et al. (2007). "GST genotypes and lung cancer susceptibility in Asian populations with indoor air pollution exposures: A meta-analysis." Mutat Res Rev Mutat Res **636**(1-3): 134-143.
- Iarmarcovai, G., A. Botta, et al. (2007). "Micronuclei and genetic polymorphisms: from exposure to susceptibility." Annales De Biologie Clinique **65**(4): 357-363.
- Irons, R. M. A., W. Quick, et al. (2000). The fate of trace elements in pulverised fuel (PF) combustion systems, PowerGen UK plc, CRE Group Ltd, University of Nottingham. **R193**.
- Kirsch-Volders, M., R. A. Mateuca, et al. (2006). "The effects of GSTM1 and GSTT1 polymorphisms on micronucleus frequencies in human lymphocytes in vivo." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **15**(5): 1038-42.
- Kubiak, R., J. Belowski, et al. (1999). "Biomarkers of carcinogenesis in humans exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons." Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis **445**(2): 175-180.
- Kuljukka-Rabb, T., L. Nylund, et al. (2002). "The effect of relevant genotypes on PAH exposure-related biomarkers." J Expo Anal Environ Epidemiol **12**( 1): 81-91.
- Kvitko, Nunes JC, et al. (2000). "Cytochrome P4501A1 polymorphisms in South American Indians." Hum Biol **72**(6): 1039-43.
- León-Mejía, G., L. Espitia-Pérez, et al. (2011). "Assessment of DNA damage in coal open-cast mining workers using the cytokinesis-blocked micronucleus test and the comet assay." Science of the Total Environment **409**: 686-691.
- Liu, G., Z. Niu, et al. (2008). "Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from coal combustion: emissions, analysis, and toxicology." Rev Environ Contam Toxicol. **192**: 1-28.



- Lum, A. and L. Le Marchand (1998). "A simple mouthwash method for obtaining genomic DNA in molecular epidemiological studies." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **7**(8): 719-724.
- Mateuca, R., P. V. Aka, et al. (2005). "Influence of hOGG1, XRCC1 and XRCC3 genotypes on biomarkers of genotoxicity in workers exposed to cobalt or hard metal dusts." Toxicology Letters **156**(2): 277-288.
- Minozzo, R., L. I. Deimling, et al. (2010). "Cytokinesis-blocked micronucleus cytome and comet assays in peripheral blood lymphocytes of workers exposed to lead considering folate and vitamin B12 status." Mutation Research **697**(1-2): 24-32.
- NIOSH (1991). National Institute for Occupational Safety and Health - Registry of toxic effects of chemical substances: Coal, ground bituminous. . P. H. S. U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control, National Institute for Occupational Safety and Health, Division of Standards Development and Technology Transfer, Technical Information Branch. . Cincinnati, OH.
- Pavanello, S., A. Pulliero, et al. (2005). "Reduced nucleotide excision repair and GSTM1-null genotypes influence anti-B[a]PDE-DNA adduct levels in mononuclear white blood cells of highly PAH-exposed coke oven workers." Carcinogenesis **26**(1): 169-175.
- Qiu, L., S. Leng, et al. (2007). "Path analysis of biomarkers of exposure and early biological effects among coke-oven workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons." Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention **16**(6): 1193-9.
- Schins, R. and P. Borm (1999). "Mechanisms and Mediators in Coal Dust Induced Toxicity: A Review." Ann. Occup. Hyg. **32**(1): 7 - 33.
- Singh, N. P., M. T. McCoy, et al. (1988). "A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells." Experimental Cell Research **175**(1): 184-191.

- Soukup, D., Buck, Brenda, Goossens, Dirk ,Teng, Yuanxin and Baron, Dirk (2007). Chapter 8: Mineralogical Composition. Mineralogical composition of soil samples in the Nellis dune recreation area.
- Sram, R. J., O. Beskid, et al. (2007). "Chromosomal aberrations in environmentally exposed population in relation to metabolic and DNA repair genes polymorphisms." Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen. **620**(1-2): 22-33.
- Tice, R. R., E. Agurell, et al. (2000). "Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing." Environ Mol Mutagen **35**(3): 206-21.
- Villarini, M., M. Moretti, et al. (2008). "Evaluation of Primary DNA Damage, Cytogenetic Biomarkers and Genetic Polymorphisms for CYP1A1 and GSTM1 in Road Tunnel Construction Workers." J. Toxicol. Environ. Health A **71**(21): 1430 - 1439.
- White, P. A. (2002). "The genotoxicity of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in complex mixtures." Mutat Res Rev Mutat Res **515**(1-2): 85-98.
- Yucesoy, B., V. J. Johnson, et al. (2005). "Lack of association between antioxidant gene polymorphisms and progressive massive fibrosis in coal miners." Thorax **60**(6): 492-495.
- Zhai, R., G. Liu, et al. (2002). "Genetic Polymorphisms of MnSOD, GSTM1, GSTT1, and OGG1 in Coal Workers' Pneumoconiosis." Journal of Occupational and Environmental Medicine **44**(4): 372-377.
- Zhang, Q., J. Dai, et al. (2002). "Roles of bioavailable iron and calcium in coal dust-induced oxidative stress: possible implications in coal workers' lung disease." Free Radical Research **36**(3): 285-94.

## **C**APÍTULO II

**“EFEITO DOS POLIMORFISMOS EM GENES DE REPARAÇÃO DE DNA DA VIA BER SOBRE AS FREQUÊNCIAS DE MICRONÚCLEOS PRESENTES EM POPULAÇÕES EXPOSTAS A RESÍDUOS DE MINERAÇÃO DE CARVÃO A CÉU ABERTO”.**

## APRESENTAÇÃO

Os sistemas de reparação de DNA podem ser considerados como uma das principais defesas contra as agressões do meio ambiente. Deste modo, foi decidido neste Capítulo II explorar se alguns polimorfismos em genes de reparação de DNA poderiam ter influência na elevada frequência de MN na população estudada. Considerando o tipo de dano no DNA esperado na exposição (bases oxidadas e quebras de cadeia simples), foram estudados os polimorfismos *XRCC1*<sub>194Trp</sub> e *OGG1*<sub>326Cys</sub> da via de Reparo por Excisão de Bases (BER).

Os resultados obtidos neste capítulo indicaram que os polimorfismos em genes de reparação de DNA não geraram um impacto sobre as frequências de MN. Entretanto, o genótipo *XRCC1*<sub>194Trp</sub>/- apresentou uma tendência de proteção em indivíduos expostos, embora não tenha sido significativa. Esta tendência ocorreu tanto no grupo de indivíduos não-expostos como nos expostos.

## 1. MATERIAIS E MÉTODOS

### 1.1 Detecção dos polimorfismos para XRCC1<sub>194Trp</sub> e OGG1<sub>326Cys</sub>

Os sistemas polimórficos foram analisados pela técnica de PCR-RFLP. Os primers, bem como as enzimas de restrição específicas, foram utilizados conforme descritos na literatura (Tabela 6).

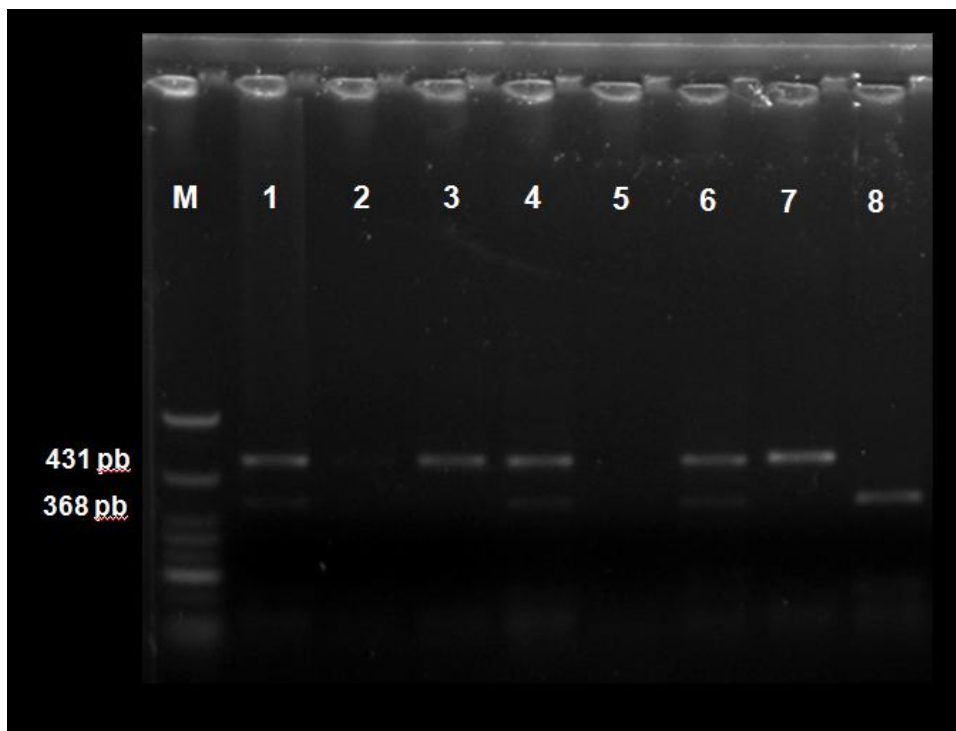
#### 1.1.1 Condições de amplificação e digestão do polimorfismo XRCC1<sub>Arg194Trp</sub>

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

- 100 ng de DNA genômico
- 10 pmol de cada primer
- Tampão 1 X (Invitrogen)
- 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen)
- 1 µM de cada dNTP
- 1,0 U Taq DNA Polimerase (Invitrogen).

O programa de temperatura utilizado foi: 2 minutos de desnaturação inicial a 95°C, 12 ciclos em touchdown de 20 segundos a 95°C, 15 segundos a 67°C (decrecendo em uma taxa de 1°C por ciclo) e 1 minuto a 72°C, seguidos de 24 ciclos de 95°C por 40 segundos, 40 segundos a 55°C, 30 segundos a 72°C e mais 10 minutos de extensão final a 72°C.

Os fragmentos amplificados foram clivados com 1U da enzima de restrição PvuII a 37°C, por 8hs. A análise dos genótipos foi feita em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo (Figura 7).



**Figura 7.** Análise PCR-RFLP para o polimorfismo *XRCC1*<sub>194Trp</sub>. **Linha 1:** Indivíduo heterozigoto (Arg/Trp, fragmentos de 431 e 368 pb), **Linha 3:** Indivíduo selvagem (Arg/Arg sem sítio de corte, fragmento de 431 pb) e **Linha 8:** Indivíduo homozigoto mutante (Trp/Trp, fragmentos de 368 pb). **M:** Marcador de peso.

**TABELA 6.** Detalhes técnicos usados para as análises do PCR-RFLP.

GENE	POLIMORFISMO	PRIMER	ENZIMA DE RESTRIÇÃO	TAMANHO DO FRAGMENTO (PB)	
		<b>Direto</b>			
<b><i>XRCC1</i></b>	<b><i>Arg194Trp</i></b>	GTTCCGTGTGAAGGAGGAG	PvuII	CC: 431	
		<b>Reverso</b>			
		CTTGGAGGTGCTGCCTATG		CT: 368 + 431 TT: 368	
*T <sub>a</sub> = 67 °C					
		<b>Direto</b>			
<b><i>OGG1</i></b>	<b><i>Ser326Cys</i></b>	GTGGATTCTCATTGCCTTCG	Fnu4HI	CC: 553	
		<b>Reverso</b>			
		CTGTTGCTGTCGAGACTGC		CG: 154+399+553 GG: 154+399	
*T <sub>a</sub> = 58 °C					

\*T<sub>a</sub>: temperatura de alinhamento. Adaptado de De Ruyck et al. (2005)

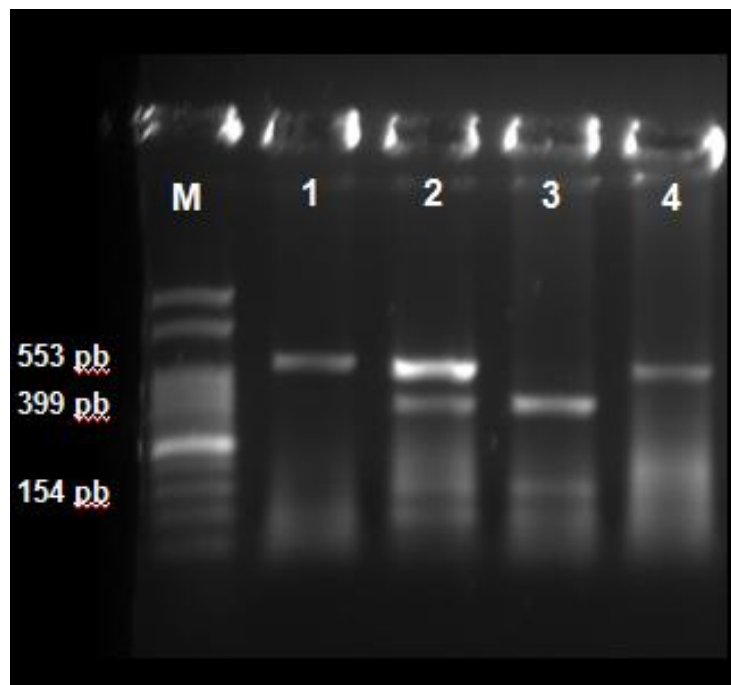
### 1.1.2 Condições de amplificação e digestão do polimorfismo *OGG1* *Ser326Cys*

A reação para a amplificação do fragmento de 672pb do gene *OGG1* foi feita em um volume total de 25 µL e consta de:

- 100 ng de DNA genômico
- 10 pmol de cada primer
- Tampão 1 X (Invitrogen)
- 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen)
- 1 µM de cada dNTP
- 1,0 U Taq DNA Polimerase (Invitrogen).

A condição de amplificação foi: 5 minutos de desnaturação inicial a 95<sup>o</sup>C, seguidos de 35 ciclos de 40 segundos a 95<sup>o</sup>C, 40 segundos a 58<sup>o</sup>C e 30 segundos a 72<sup>o</sup>C, e mais 5 minutos de extensão final a 72<sup>o</sup>C.

Após a amplificação os fragmentos de 672pb foram clivados com 1U da enzima de restrição *Fnu4HI*, por 8hs a 37<sup>o</sup>C, sendo a visualização dos genótipos realizada em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo (Figura 8).



**Figura 8.** Análise PCR-RFLP para o polimorfismo *OGG1*<sub>326Cys</sub> **Linha 1:** Indivíduo selvagem (Ser/Ser sem sítio de corte, fragmento de 553 pb), **Linha 2:** Indivíduo heterozigoto (Ser/Cys, fragmentos de 553, 399 e 154 pb), e **Linha 3:** Indivíduo homozigoto mutante (Cys/Cys, fragmentos de 399 e 154 pb). **M:** Marcador de peso.



## 1.2 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o pacote estatístico SPSS 15.0.7 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA). O teste de equilíbrio de Hardy – Weinberg para os genótipos de *XRCC1*<sub>194Trp</sub> e *OGG1*<sub>326Cys</sub> entre os grupos foi calculado usando um teste  $\chi^2$  com um grau de liberdade.

O teste  $\chi^2$  de Pearson foi utilizado para avaliar as diferenças na distribuição das frequências alélicas entre indivíduos expostos e não expostos. Para todos os genes os portadores dos polimorfismos heterozigotos e homozigotos foram classificados como genótipos polimórficos sendo combinados na análise estatística, devido ao pequeno número de homozigotas variantes. O risco relativo (RR) e os intervalos de confiança dos 95% (95% CI) foram obtidos na análise de regressão de Poisson para avaliar a associação entre a frequência de MN e os polimorfismos nos genes de reparação (*XRCC1*<sub>194Trp</sub> e *OGG1*<sub>326Cys</sub>). Foi estabelecida uma significância estatística de  $p < 0,05$  ( $\alpha$ ) com um poder ( $\beta$ ) em  $\geq 0,8$ .

## 2. RESULTADOS

Utilizando a mesma população descrita no Capítulo I, foi avaliado se alguns polimorfismos em genes de reparação de DNA poderiam ter influência na elevada frequência de MN na população estudada.

As frequências gênicas e genóticas para o polimorfismo *XRCC1<sub>194Trp</sub>* (Tabelas 7 e 8) foram similares as previamente descritas em populações Colombianas (Hoyos-Giraldo et al., 2009) e outras populações do sul do Brasil (Rohr et al., 2010; Rossit et al., 2002), americanos caucasianos (Smith et al., 2003) e afro-americanos (David-Beabes and London, 2001). Para o polimorfismo *OGG1<sub>326Cys</sub>*, as frequências gênicas encontradas foram similares às descritas previamente em populações caucásicas (De Ruyck et al., 2007; Goode et al., 2002; Hung et al., 2005) e do Sul do Brasil (Rohr et al., 2010) (Tabelas 7 e 8).

Ao aplicar o teste de Hardy-Weinberg, foi observado que as populações não se encontram em equilíbrio para os dois sistemas *XRCC1<sub>194Trp</sub>* e *OGG1<sub>326Cys</sub>*. A distribuição das frequências genóticas esperadas e observadas são encontradas na Tabela 9.

O risco relativo (RR) foi calculado utilizando-se o genótipo selvagem como referência (genótipo de menor risco). Nenhum dos polimorfismos avaliados *XRCC1<sub>194Trp</sub>* ( $p=0,27$ ) e *OGG1<sub>326Cys</sub>* ( $p=0,59$ ) apresentou influência sobre as frequências de MN detectadas. A influência dos genótipos estudados na frequência de MN foi avaliada pela utilização de uma análise de regressão de Poisson. Contudo, foi observado que no grupo de indivíduos com genótipo *Arg/Trp*, *Trp/Trp* para *XRCC1* houve uma tendência à diminuição na frequência de MN apesar de não ter sido estatisticamente significativa. Esta tendência ocorreu tanto no grupo de indivíduos não-expostos como nos expostos (Tabela 10).

O teste de Mann-Whitney, realizado para avaliar a possível interação entre os polimorfismos dos dois genes, também não demonstrou diferença estatisticamente significativa ( $p=0,81$ ) embora tenha sido percebida redução no número de micronúcleos observados para indivíduos com o genótipo *Arg/Trp*, *Trp/Trp* de *XRCC1*.

**TABELA 7.** Frequência de polimorfismos de genes de reparação em diferentes populações.

<b>Gene</b>	<b>Polimorfismo</b>	<b>População</b>	<b>Frequência do alelo raro</b>	<b>Referência</b>
<b><i>XRCC1</i></b>	<b><i>Arg194Trp</i></b>	Colombiana	0,09	(Hoyos-Giraldo, Carvajal et al. 2009)
		Euro-Brasileiro	0,08	(Rossit, Cabral et al. 2002)
			0,08	(Rohr, da Silva et al. 2010)
		Americanos caucasianos	0,07	(Smith, Miller et al. 2003)
		Afroamericanos	0,08	(David-Beabes and London 2001)
<b><i>OGG1</i></b>	<b><i>Ser326Cys</i></b>	Caucásicos	0,06 – 0,35	(Goode, Ulrich et al. 2002)
			0,2	(Hung, Hall et al. 2005)
			0,21	(De Ruyck, Van Eijkeren et al. 2005)
		Euro-Brasileiro	0,2	(Rohr, da Silva et al. 2010)

**TABELA 8.** Distribuição dos genótipos de XRCC1 e OGG1 e das frequências alélicas nos grupos controle e expostos.

Gene	Genótipo	Grupo Não Exposto (n=100) (%)	Grupo Exposto (n=100) (%)	Total (n=200) (%)	Frequência Alélica / Genotípica
<b>**XRCC1</b> <i>Arg194Trp</i>	<i>Arg/Arg</i>	93(93)	85 (85)	178 (89)	
	<i>Arg/Trp</i>	5 (5)	10 (10)	15 (8)	<i>Arg: 0,93</i>
	<i>Trp/Trp</i>	2 (2)	5 (5)	7(4)	<i>Trp: 0,07</i>
<b>**OGG1</b> <i>Ser326Cys</i>	<i>Ser/Ser</i>	56 (56)	63 (63)	119 (60)	
	<i>Ser/Cys</i>	25 (25)	21 (21)	46 (23)	<i>Ser: 0,71</i>
	<i>Cys/Cys</i>	19 (19)	16 (16)	35 (18)	<i>Cys: 0, 29</i>

\* Determinado pelo teste  $\chi^2$  – p value < 0,05

\*\*Não se encontram em equilíbrio Hardy-Weinberg

**TABELA 9.** Distribuição das frequências observadas e esperadas para os grupos casos e controles.

Gene	Genótipo	Expostos		Controles	
		Observado	Esperado <sup>a</sup>	Observado	Esperado
<b><i>XRCC1</i></b> <i>Arg194Trp</i>	<i>Arg/Arg</i>	85	81	93	91,2
	<i>Arg/Trp</i>	10	18	5	8,6
	<i>Trp/Trp</i>	5	1	2	0,2
<b><i>OGG1</i></b> <i>Ser326Cys</i>	<i>Ser/Ser</i>	63	54	56	47
	<i>Ser/Cys</i>	21	39	25	43
	<i>Cys/Cys</i>	16	7	19	10

<sup>a</sup>Determinado pelo teste  $\chi^2$ .

**TABELA 10.** Análise da regressão de Poisson para os Micronúcleos: Efeito dos genótipos individuais em grupos controles não expostos e nos grupos expostos a resíduos de mineração de carvão.

Gene	Genótipo	Exposição	Frequência de MN (média $\pm$ SD <sup>a</sup> )	RR <sup>b</sup>	IC <sup>d</sup> 95%	p-valor
		Controle	2,97 $\pm$ 4,01	-----	-----	-----
		Exposto	8,56 $\pm$ 4,78	2,88	2,525 – 3,284	<0,001*
<b><i>XRCC1</i></b> <i>Arg194Trp</i>	<i>Arg/Arg</i>	Controle	3,04 $\pm$ 4,09	Referência	-----	-----
	<i>Arg/Trp, Trp/Trp</i>	Controle	2,50 $\pm$ 1,76	0,822	0,489 – 1,381	0,4586
	<i>Arg/Arg</i>	Exposto	8,65 $\pm$ 4,77	2,842	2,481 – 3,257	<0,001
	<i>Arg/Trp, Trp/Trp</i>	Exposto	7,93 $\pm$ 5,15	2,608	2,106 – 3,228	<0,001
<b><i>OGG1</i></b> <i>Ser326Cys</i>	<i>Ser/Ser</i>	Controle	2,95 $\pm$ 3,99	Referência	-----	-----
	<i>Ser/Cys, Cys/Cys</i>	Controle	3,09 $\pm$ 4,01	1,048	0,836 – 1,315	0,6802
	<i>Ser/Ser</i>	Exposto	8,57 $\pm$ 4,72	2,908	2,446 – 3,458	<0,001
	<i>Ser/Cys, Cys/Cys</i>	Exposto	8,49 $\pm$ 5,02	2,879	2,387- 3,472	<0,001

<sup>a</sup> S.D.: Desvio-padrão

<sup>b</sup> RR: Risco relativo

<sup>c</sup> Referência: calculada usando o genótipo selvagem como referência (genótipo de menor risco).

<sup>d</sup> CI: intervalo de confiança

<sup>e</sup> Análise de regressão de Poisson p <

# **D** ISSCUSSÃO GERAL

## **1. DETECÇÃO DE DANO CITOGÉNÉTICO E GENOTÓXICO EM TRABALHADORES DE MINERAÇÃO DE CARVÃO A CÉU ABERTO.**

Os efeitos da mineração de carvão sobre os sistemas biológicos e o DNA têm sido referenciados por inúmeras investigações ao redor do mundo (Freitas et al., 2009; León-Mejía et al., 2011; Maria et al., 2007). Contudo, a grande maioria dos resultados têm sido gerados após a avaliação da exposição a sistemas de mineração de tipo subterrâneo, que podem ser de grande risco se considerarmos as emanações de gases e metais e ao reduzido espaço. Esta tendência tem ocasionado um completo desconhecimento dos possíveis efeitos mutagênicos ou genotóxicos que outros tipos e sistemas de mineração poderiam estar ocasionando sobre as populações expostas.

Levando em consideração este panorama, no Capítulo I desta dissertação avaliamos a presença de efeitos mutagênicos e genotóxicos em uma população exposta aos resíduos de mineração de carvão a céu aberto na maior mina deste tipo do mundo, localizada na região de Guajira, ao norte da Colômbia.

Os resultados obtidos evidenciaram um incremento na frequência de MN e de dano no DNA determinado pelo Ensaio Cometa (Capítulo I, Anexo I) na população exposta, coincidindo com outros estudos de tipo transversal em trabalhadores expostos a carvão pelas atividades de transporte de resíduos e cinzas (Celik et al., 2007).

Nesta dissertação, a determinação qualitativa e quantitativa das substâncias envolvidas na geração do dano observado constituiu um dos maiores desafios. Uma das principais razões é que mineração a céu aberto pode liberar para a atmosfera grandes quantidades de material fugitivo geralmente menor a 100 microns de tamanho (Vora, 2010) e constituído por CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub> (ANEEL, 2007), metais pesados, pó e material particulado (Borm and Schins, 2001), sílica e HAPs, sendo estes últimos reconhecidos por seus efeitos carcinogênicos em humanos (Liu et al., 2008). Cada uma das substâncias citadas tem a capacidade de gerar lesões que podem desencadear o aparecimento de danos no DNA e a formação de MN. Outro aspecto que dificulta o estudo dos elementos envolvidos na indução de dano no DNA é que, em minas a céu aberto, estas substâncias, uma vez na



atmosfera, podem se combinar e constituir misturas complexas (Reynolds et al., 2003). Testar misturas complexas representa um importante problema científico se considerarmos que as maiorias das informações disponíveis têm sido obtidas em estudos com substâncias individuais que não podem ser simplesmente extrapoladas para misturas de químicos (Muller et al., 2002). Mesmo conhecendo os níveis e concentração dos compostos individuais com efeitos genotóxicos ou mutagênicos dentro da mistura, os efeitos observados não poderiam ser previstos devido às possíveis interações de tipo aditivo, antagonista ou sinérgico que poderiam ocorrer. Além disso, não existem estratégias especiais ou protocolos disponíveis para a determinação dos efeitos tóxicos das misturas complexas. O conceito fundamental da avaliação são os mesmos que têm sido usados para as substâncias individuais (Yang et al., 1989). Dentro da mina, a principal rota de exposição dos trabalhadores a este tipo de mistura se dá pela inalação do material. Hoje é conhecido que a inalação crônica desta mistura pode estar envolvida na aparição de doenças pulmonares (pneumoconiose, bronquite, perda de função pulmonar e enfisema) e até câncer (Evans et al., 2004), e que a geração de ERO poderia ter um importante papel no aparecimento de danos celulares desencadeantes deste tipo de doenças (Benassi et al., 2004; Knaapen et al., 2004).

A composição qualitativa das possíveis substâncias presentes no ambiente de trabalho depende principalmente da composição do carvão explorado. A abundância dos diferentes químicos minerais no carvão do “El Cerrejon”, determinado por microscopia eletrônica de varredura (CCSEM), revelou que uma porcentagem maior que 80% do peso da matéria mineral é formada por minerais de argila e quartzo (Alsil, Si-alsil e Si) (Irons et al., 2000). A Conferência Americana de Higienistas Industriais (ACGIH) considera a toxicidade do pó de carvão com porcentagem maior que 5% de sílica semelhante à toxicidade da sílica (ACGIH, 1991). A exposição ao quartzo é continuamente relacionada com o desenvolvimento de câncer de pulmão, bronquite crônica e enfisema pulmonar (Adamis and Williams, 2005) e, mais recentemente, tem sido relacionada com um aumento na frequência de MN em trabalhadores de minas de carvão (Ulker et al., 2008) e em outros ambientes de trabalho (Demircigil et al., 2010).

Considerando que a formação de MN é produzida a partir de quebras de fita dupla (Leng et al., 2005), que o ensaio cometa alcalino pode detectar por sua vez quebras de fitas simples, sítios álcali-lábies e sítios de reparação por excisão incompleta e sem considerar a natureza e extensão das possíveis interações geradas pela complexidade da exposição, alguns dos mecanismos que poderiam estar envolvidos no aumento no dano do DNA e na frequência de MN observado (Capítulo I, Anexo I) incluem o dano oxidativo gerado por ERO e a formação de adutos de tipo HAPs-DNA.

A formação de MN é gerado por uma série de danos no DNA, especialmente de natureza oxidativa (Record and Jannes, 2000). De fato, alguns estudos têm evidenciado que a formação de MN pode ser uma medida sensível ao dano oxidativo no DNA (Kobus et al., 1993). A maioria das substâncias descritas acima como possíveis agentes genotóxicos correlacionados com a toxicidade do carvão, são conhecidas por gerar dano no DNA por lesões oxidativas. O pó de carvão é uma importante fonte celular e não celular de ERO no pulmão, e pode estar fortemente envolvida com o dano nas células alvo deste tecido, assim como em importantes macromoléculas como o DNA (Schins and Borm, 1999).

Os HAPs gerados pela combustão espontânea do carvão armazenado a céu aberto também têm sido relacionados com a geração de ERO (Liu et al., 2010). Muitos HAPs, particularmente aqueles compostos por cinco e seis anéis podem ser metabolizados a diol epóxidos, constituindo mutágenos e carcinógenos animais (White, 2002a). Seu metabolismo *in vivo* pode resultar na produção de metabólitos electrofílicos que se ligam de forma covalente ao DNA, formando adutos com as purinas depois de sua ativação metabólica (que envolve o complexo enzimático P450) (Tarantini et al., 2011a), e têm sido associados com um aumento no risco de câncer de mama (Gammon and Santella, 2008), pulmão, pele e bexiga (Burstyn et al., 2007).

Por outro lado, acredita-se que um dos eventos mais importantes na geração de dano pela exposição à sílica envolve o dano na membrana celular devido a interações com partículas minerais. Este dano na membrana celular libera algumas enzimas líticas que podem gerar dano celular adicional. Alguns estudos têm sugerido que radicais livres a

base de sílica ( $\text{Si}^\cdot$  e  $\text{SO}^\cdot$ ) sobre a superfície da sílica fraturada e a geração associada de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e radicais hidroxil ( $\text{OH}^\cdot$ ) poderiam estar direta ou indiretamente envolvidos no mecanismo de peroxidação lipídica e na perda de integridade da membrana (Demircigil et al., 2010).

Infelizmente, por falta de uma caracterização qualitativa e quantitativa dos diferentes ambientes de trabalho do interior da mina, somente foi possível especular sobre os compostos e substâncias que poderiam ter algum tipo de influência sobre a elevada frequência de MN e o dano no DNA evidenciado pelo ensaio cometa, com base nos relatos de sua presença neste tipo de ambientes de mineração e seus efeitos genotóxicos conhecidos. Em estudos futuros, é importante incluir no conjunto de análises uma completa triagem da composição do material respirável dentro da mina. Outra possibilidade é a caracterização dos efeitos biológicos dos compostos individuais e combinados, usando diferentes tipos de testes *in vitro* e modelos animais.

## **2. EFEITO DOS POLIMORFISMOS EM GENES DE METABOLISMO DE XENOBIÓTICOS SOBRE AS FREQUÊNCIAS DE MICRONÚCLEOS E O DANO NO DNA DETECTADO PELO ENSAIO COMETA EM POPULAÇÕES EXPOSTAS A RESÍDUOS DE MINERAÇÃO DE CARVÃO A CÉU ABERTO.**

Considerando as principais rotas no metabolismo de algumas das substâncias suspeitas de estarem envolvidas no aumento na frequência de MN e o dano no DNA evidenciado pelo ensaio cometa, o passo seguinte foi conhecer melhor a possível interação entre a presença de dano e alguns polimorfismos em genes do metabolismo de xenobióticos. Assim, no Capítulo I também foram avaliados polimorfismos nas maiores vias de metabolização, as vias do Citocromo P450 ( $\text{CYP1A1}_{Msp1}$ ) e da Glutathione ( $\text{GSTM1}_{nulo}$  e  $\text{GSTT1}_{nulo}$ ).

A maioria dos carcinógenos ambientais, incluindo os HAPs, precisam da ativação metabólica pelos Citocromos P450 ( $\text{CYPs}$ ), enzimas da fase I, para produzir os intermediários electrofílicos reativos responsáveis pelos efeitos mutagênicos e

consequentemente carcinogênicos característicos de cada agente. Por esta razão, a expressão dos CYPs nos tecido alvo, contribui significativamente ao processo da carcinogênese química (Bartsch et al., 2000). Tem sido demonstrado que a atividade e expressão de *CYP1A1*, uma das maiores enzimas de metabolização de carcinógenos, pode ser induzida pelos HAPs mediante ativação do receptor Aril hidrocarbono (AhR). Pela ligação dos HAPs o AhR é ativado e translocado desde o citosol até o núcleo onde heterodimeriza com o translocador nuclear de AhR (Arnt). Este complexo imediatamente se liga aos Elementos de Resposta a Xenobióticos (XRE) nas regiões indutoras de vários genes, incluindo o *CYP1A1*, um dos alvos mais sensíveis a serem up-regulados (Fujii-Kuriyama and Mimura, 2005). Embora esta via esteja bem conservada em espécies de mamíferos, a expressão e a indução do *CYP1A1* é altamente variável, sendo isto atribuído principalmente à presença de diferenças genéticas (polimorfismos), o que contribui significativamente para as diferenças na susceptibilidade a carcinógenos químicos (Saurabh et al., 2010).

O *CYP1A1* apresenta vários sítios polimórficos bem conhecidos. A mutação conhecida como *Msp1* resulta em uma enzima AHH altamente reativa, com uma elevada atividade oxidativa que gera uma maior produção de metabólitos reativos (Smith et al., 2001) associados ao dano no DNA e a formação de adutos. Este polimorfismo tem sido relacionado com câncer de pulmão (Zhan et al., 2010), cólon (Pande et al., 2008), mama (Shen et al., 2006) e esôfago (Zhuo et al., 2009).

Por outro lado, os processos da fase II do metabolismo de xenobióticos que envolvem a detoxificação por conjugação com a glutatona se encontram envolvidos em maior ou menor medida no metabolismo de uma ampla variedade de agentes xenobióticos electrófilicos (Kirsch-Volders et al., 2006), incluindo o material particulado, produtos de stress oxidativo e alguns carcinógenos (Carlsten et al., 2008). O material particulado é produzido durante as atividades de mineração a céu aberto e pode gerar lesões oxidativas relacionadas com a produção de ERO pela sua inalação no interior do organismo (Kelly and Sandström, 2004). Ao atuar como defesas antioxidantes, as Glutonas S-transferases (GST) são expressas em maior quantidade no trato respiratório

(Gilliland et al., 2004), a principal via de exposição dos trabalhadores aos resíduos de mineração de carvão.

Dada a importância das GST na detoxificação de carcinógenos electrofílicos, os genótipos nulos de *GSTM1* e *GSTT1* têm sido objeto de várias investigações devido a que as deleções homozigotas podem resultar em uma capacidade diminuída na detoxificação de carcinógenos, aumentando o risco de desenvolvimento de câncer em indivíduos portadores dos polimorfismos *GSTM1*<sub>nulo</sub> e/ou *GSTT1*<sub>nulo</sub> (Parl, 2005).

Os nossos resultados descritos no Capítulo I não permitiram estabelecer nenhum tipo de correlação entre a presença do polimorfismo *Msp1* do *CYP1A1* e os polimorfismos nulos do *GSTM1/T1* com o aumento na frequência de MN e dano no DNA na população estudada. Contrariamente, Kuljukka-Rabb et al. (2002) e Godderis et al. (2006) demonstraram que o genótipo *Msp1* do *CYP1A1* se encontra associado respectivamente, com a presença de elevados níveis de adutos de DNA em trabalhadores de fornos de carvão e com altas frequências de dano genotóxico detectado com o ensaio cometa em trabalhadores expostos a fumaça de carvão. Por outro lado, um recente estudo revelou que um aumento na frequência de MN não depende na maioria dos casos dos polimorfismos em genes do metabolismo de xenobióticos (Mateuca et al., 2005). Uma metá-análise realizado por Kirsch-Volders et al. (2006) demonstrou que somente dois de oito estudos sobre a influência dos polimorfismos em genes das GST sobre as frequências de MN apresentaram diferenças significantes, e unicamente para o *GSTM1*.

Outra explicação para a falta de influência dos polimorfismos do metabolismo de xenobióticos sobre o aumento na frequência de MN e os valores de dano no DNA pode estar relacionada com a natureza da exposição. Como já foi discutido acima, muito provavelmente em sistemas de mineração a céu aberto, a maior causa do dano detectado seja a exposição a misturas complexas. A esse respeito, Marston et al. (2001) demonstraram que dentro de misturas complexas os HAPs podem interagir e atuar como co/anti-carcinógenos, aumentando ou inibindo os efeitos tóxicos em modelos animais e consequentemente afetando a toxicidade da mistura resultante. Desta forma, um efeito

inibitório suficientemente forte poderia resultar em uma diminuição na indução do *CYP1A1* pelos HAPs e na formação de adutos HAPs-DNA. Os resultados deste estudo são consistentes com a hipótese de que a persistência de certos tipos de adutos HAPs-DNA (e não só os níveis de adutos) podem estar envolvidos no potencial carcinogênico das misturas complexas. Assim sendo, o maior determinante da atividade carcinogênica de uma mistura complexa é a capacidade dos HAPs dentro da mistura de inibirem a ativação dos HAPs carcinogênicos pelas enzimas CYPs induzidas (Liu et al., 2008). Uma diminuição na indução de *CYP1A1* e por tanto, na produção de metabólitos reativos desde a fase I, poderia explicar por sua vez, a falta de influência encontrada nas enzimas da fase II (GST).

### **3. EFEITO DOS POLIMORFISMOS EM GENES DE REPARAÇÃO DE DNA DA VIA BER SOBRE AS FREQUÊNCIAS DE MICRONÚCLEOS PRESENTES EM POPULAÇÕES EXPOSTAS A RESÍDUOS DE MINERAÇÃO DE CARVÃO A CÉU ABERTO.**

Considerando que a formação de MN é produzida a partir de quebras de fita dupla no DNA, e que este tipo de lesão pode ser gerado pelo reparo deficiente de quebras de fita simples (Leng et al., 2005) e de lesões oxidativas (Lloyd et al., 1998), no Capítulo II desta dissertação avaliamos a influência dos polimorfismos *XRCC1*<sub>194Trp</sub> e *OGG1*<sub>326Cys</sub> sobre a frequência de MN.

Os nossos resultados mostraram que não houve influência dos diferentes polimorfismos *XRCC1*<sub>194Trp</sub> e *OGG1*<sub>326Cys</sub> na frequência de micronúcleos em indivíduos expostos e controles. Entretanto, foi observado que no grupo de indivíduos com genótipo *Arg/Trp*, *Trp/Trp* para *XRCC1* houve uma tendência à diminuição na frequência de MN apesar de não terem sido estatisticamente significantes. Este tipo de tendência que parece mostrar um efeito “protetor” do alelo tem sido demonstrada em outros estudos (Breton et al., 2007; Lao et al., 2008) e esteve presente tanto no grupo de indivíduos controle como nos indivíduos expostos.

A evidência sobre este possível efeito protetor é cada vez maior (Rohr et al., 2010; Stern et al., 2001) e parece indicar que talvez uma capacidade diminuída de reparo em

BER poderia ter um efeito protetor devido à possibilidade de que células extremadamente danificadas poderiam sofrer um processo apoptótico em vez de serem reparadas pela BER (Dianov et al., 2003).

Uma possível explicação para este fenômeno, segundo Bretton et al. (2007), envolve a localização do polimorfismo na estrutura do gene. O polimorfismo *XRCC1<sub>194Trp</sub>* se localiza na região de união entre o domínio da Pol $\beta$  e a PARP. Assim, o polimorfismo pode afetar a habilidade de XRCC1 de se unir à Pol $\beta$  e a PARP (Frosina, 2004). Se isto resultasse em uma diminuição na capacidade de reparação de DNA, poderia ser aumentado o acúmulo de lesões sem serem reparadas, o que poderia favorecer a apoptose e assim reduzir a capacidade do ciclo celular de replicar DNA mutado (Nelson et al., 2002). No entanto, a evidência experimental que demonstra a possível alteração funcional do *XRCC1<sub>194Trp</sub>* é ainda limitada (Zienolddiny et al., 2006).

Outra explicação para o efeito protetor inclui a down-regulação de algumas proteínas de reparo pelo ambiente de trabalho e a exposição, o que poderia ser alelo específico. Deste modo o polimorfismo selvagem seria mais fortemente regulado e o reparo mais fortemente inibido nos indivíduos de genótipo selvagem, gerando um efeito protetor nos genótipos heterozigotos e homozigotos mutantes (Breton et al., 2007).

Por outro lado, para o gene OGG1, a tendência demonstrou um aumento na frequência de MN para os indivíduos controle com genótipo Ser/Cys e Cys/Cys, apesar de não terem sido estatisticamente significantes. Este tipo de tendência poderia significar presença de um efeito do genótipo nos níveis basais do biomarcador (Norppa, 2004), o qual tem sido demonstrado em outros estudos (Klungland and Bjelland, 2007; Mateuca et al., 2008; Sellappa et al., 2009).

Convém salientar que, a falta de significância estatística presente nos resultados anteriores poderia ser provavelmente causada pela escassa frequência dos alelos variantes na população estudada. Devido à rara presença de *XRCC1<sub>194Trp</sub>* entre populações previamente descritas (Goode et al., 2002; Rohr et al., 2010), existem poucos estudos na literatura com o suficiente poder estatístico para descrever os efeitos do polimorfismo

sobre o dano/reparo do DNA evidenciado com a maioria dos biomarcadores citogenéticos usados (Goode et al., 2002), o que justifica o porquê a maioria das associações são conflitantes.

O *OGG1*<sub>326Cys</sub>, tem uma frequência maior dentro da população estudada, e consequentemente a falta de significância também poderia refletir o fenômeno descrito por Janssen et al. (2001), que demonstraram que a atividade do OGG1 em linfócitos humanos é constantemente expressa e que a capacidade de reparo de OGG1 nem sempre se encontra associada ao polimorfismo *OGG1*<sub>326Cys</sub>. Nesse cenário, convém salientar que a baixa atividade de OGG1 observada em fibroblastos humanos (Cappelli et al., 2000) e os baixos níveis de produção da proteína em estratos de diferentes linhagens celulares (Jansen et al., 2001) sugerem que o reparo do 8oxoG é menos eficiente comparado com outros tipos de lesões do DNA. Desta forma, estes últimos autores sugerem que o polimorfismo seja relevante somente quando OGG1 é expresso em grandes quantidades.

As frequências gênicas e genótípicas verificadas neste trabalho para o polimorfismo *XRCC1*<sub>194Trp</sub> foram similares às previamente descritas em populações Colombianas (Hoyos-Giraldo et al., 2009) e outras populações do sul do Brasil (Rossit et al., 2002), americanos caucasianos (Smith et al., 2003) e afro-americanos (David-Beabes and London, 2001). Para o polimorfismo *OGG1*<sub>326Cys</sub>, as frequências gênicas encontradas foram similares às descritas previamente em populações caucasianas (De Ruyck et al., 2007; Goode et al., 2002; Hung et al., 2005) e do Sul do Brasil (Rohr et al., 2010). Contudo, os dois polimorfismos não se encontram em equilíbrio Hardy-Weinberg. Outros trabalhos já demonstraram isso para o polimorfismo *XRCC1*<sub>194Trp</sub> (Cai et al., 2006; Ratnasinghe et al., 2004) e para *OGG1*<sub>326Cys</sub> (Obtulowicz et al., 2010).

O desequilíbrio observado demonstrou um excesso de homozigocidade na população, a qual poderia ter sido causada por uma provável endogamia na população estudada como consequência da forte mistura indígena presente na zona avaliada. Outra possível causa é a deriva genética que ocorre em populações isoladas em pequenos



grupos, o que pode levar à fixação ou eliminação de alelos. As duas explicações poderiam ser plausíveis e consistentes com a mistura indígena descrita.

# **C**ONCLUSÕES

## CONCLUSÃO GERAL

Os resultados obtidos nesta dissertação nos permitem concluir que os polimorfismos em genes de metabolismo de xenobióticos (*GSTM1<sub>nulo</sub>*, *GSTT1<sub>nulo</sub>* e *CYP1A1<sub>Msp1</sub>*) e de reparação de DNA (*XRCC1<sub>194Trp</sub>* e *OGG1<sub>326Cys</sub>*) não influenciaram a frequência de micronúcleos na população de indivíduos ocupacionalmente expostos a resíduos de mineração de carvão na jazida mineira do Cerrejón, Departamento de Guajira – Colômbia. Da mesma forma, polimorfismos em genes de metabolismo de xenobióticos (*GSTM1<sub>nulo</sub>*, *GSTT1<sub>nulo</sub>* e *CYP1A1<sub>Msp1</sub>*) não influenciaram os níveis de dano no DNA detectados pelo Ensaio cometa.

## CONCLUSÕES ESPECÍFICAS

1. As frequências alélicas de *CYP1A1<sub>Msp1</sub>* (m2:0,35), *GSTM1* (nulo:0,41) e *GSTT1* (nulo:0,2) na população estudada estiveram de acordo com o equilíbrio Hardy-Weinberg e com os valores descritos em populações caucasianas.
2. As frequências gênicas verificadas para o polimorfismo *XRCC1<sub>194Trp</sub>* (Trp: 0,07) foram similares às previamente descritas em populações Colombianas e outras populações do sul do Brasil, americanos caucasianos e afro-americanos.
3. As frequências gênicas encontradas o polimorfismo *OGG1<sub>326Cys</sub>* (Cys: 0, 29) foram similares às descritas previamente em populações caucasianas e do Sul do Brasil.
4. Os dois polimorfismos em genes de reparação de DNA não se encontraram em equilíbrio Hardy-Weinberg apresentando um excesso de homozigidade, provavelmente devida a uma possível endogamia na população estudada, se for considerada a forte mistura indígena presente na zona avaliada.

5. Os danos detectados pelo Ensaio cometa, assim como o aumento na frequência de MN observados no grupo exposto quando comparado com o grupo controle, demonstraram a presença de efeitos genotóxicos e mutagênicos em linfócitos de sangue periférico dos indivíduos expostos a resíduos de mineração de carvão.
6. Os polimorfismos em genes de metabolismo (*GSTM1<sub>1nulo</sub>*, *GSTT1<sub>1nulo</sub>* e *CYP1A1<sub>1Msp1</sub>*) e de reparação de DNA (*XRCC1<sub>1194Trp</sub>* e *OGG1<sub>1326Cys</sub>*), não influenciaram a frequência de micronúcleos na população de indivíduos ocupacionalmente expostos a resíduos de mineração de carvão. Os polimorfismos em genes de metabolismo também não influenciaram os níveis de dano no DNA detectados pelo ensaio cometa.
7. Não foi evidenciada a existência de genótipos específicos ou em combinação que constituíssem um maior risco potencial para os indivíduos em determinadas atividades dentro da cadeia de produção de carvão.

# **P** ERSPECTIVAS

Seria importante complementar os resultados obtidos na presente dissertação para um melhor entendimento dos efeitos da exposição ocupacional aos resíduos de mineração de carvão a céu aberto nas populações ocupacionalmente expostas nos seguintes aspectos:

- Correlacionar o aumento na frequência de MN com um biomonitoramento das emissões de material particulado, gases, hidrocarbonetos, metais e fumos dentro da mina e o ambiente laboral.
- Biomonitorar a população utilizando biomarcadores citogénéticos (MN, AC, TCI) com alguns biomarcadores de exposição (adutos de HAP e 8-hidroxi-2-deoxiguanosine).
- Estudar os efeitos de polimorfismos em outras vias de reparação de DNA como a via de recombinação homóloga (HR) e não homóloga (NHEJ) sobre o dano detectado.
- Aumentar o tamanho da população estudada para observar se existe ou não uma correlação entre a presença de alelos raros e a geração de dano.
- Aprofundar o conhecimento de alguns fatores de confusão como as condições de dieta, consumo de suplementos vitamínicos e algumas drogas que poderiam afetar os resultados obtidos nos biomarcadores citogenéticos.

# **R**EFERÊNCIAS

## REFERÊNCIAS

Abdel-Rahman, S.Z., El-Zein, R.A., Anwar, W.A., Au, W.W., 1996. A multiplex PCR procedure for polymorphic analysis of GSTM1 and GSTT1 genes in population studies. *Cancer Lett* 107, 229-233.

ACGIH, 1991. Documentation of the threshold limit values and biological exposure indices. Documentation of the threshold limit values and biological exposure indices. . American Conference of Governmental Industrial Hygienists. , Cincinnati, OH.

Adamis, Z.n., Williams, R., 2005. Environmental Health Criteria 231 Bentonite, Kaolin and selected clay minerals. In: Organization, W.W.H. (Ed.), vol. 1. WHO World Health Organization, Geneva, p. 175.

Adamsen, D.R., Poulsen, A.S., Swart, M.U., 2010. The Course of Coal. In: DanWatch (Ed.). DanWatch, p. 21.

ANEEL, A.N.d.E.E., 2007. Capítulo 9: Parte III: Fontes não-renováveis- Carvão Mineral. Atlas de Energia Elétrica do Brasil. Agência Nacional de Energia Elétrica (ANEEL)

ATSDR, A.F.T.S.A.D.R.-T., 1993. Toxicological profile for: Lead, Cadmium, Nickel, Vanadium and Zinc. University of Utah Available on line Website: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxfaq.html>.

Bartsch, H., Nair, U., Risch, A., Rojas, M., Wikman, H., Alexandrov, K., 2000. Genetic Polymorphism of CYP Genes, Alone or in Combination, as a Risk Modifier of Tobacco-related Cancers. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 9, 3-28.

Benassi, J.C., Geremias, R., Menezes, C.T.B., Laus, R., Favere, V.T., Laranjeiras, M.C.M., Wilhelm, D., Pedrosa, R.C., 2004. Toxicity evaluation of coal mining wastewater using



biomarkers of oxidative stress and genotoxicity in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Free Radic Biol Med* 36, S143-S143.

Board, P.G., 1981. Biochemical genetics of glutathione-S-transferase in man. *Am J Hum Genet* 33

Boiteux, S., Radicella, J.P., 2000. The Human OGG1 Gene: Structure, Functions, and Its Implication in the Process of Carcinogenesis. *Arch Biochem Biophys* 377, 1-8.

Bonassi, S., Znaor, A., Ceppi, M., Lando, C., Chang, W.P., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., Ban, S., Barale, R., Bigatti, M.P., Bolognesi, C., Cebulska-Wasilewska, A., Fabianova, E., Fucic, A., Hagmar, L., Joksic, G., Martelli, A., Migliore, L., Mirkova, E., Scarfi, M.R., Zijno, A., Norppa, H., Fenech, M., 2006. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis* 28, 625-631.

Borm, P.J.A., Schins, R.P.F., 2001. Genotype and phenotype in susceptibility to coal workers' pneumoconiosis. The use of cytokines in perspective. *Eur Respir J* 18, 127s-133s.

Brescia, G., Celotti, L., Clonfero, E., Neumann, H.G., Forni, A., Foà, V., Pisoni, M., Ferri, G.M., Assennato, G., 1999. The influence of cytochrome P450 1A1 and glutathione S-transferase M1 genotypes on biomarker levels in coke-oven workers. *Arch Toxicol* 73, 431-439.

Breton, C.V., Zhou, W., Kile, M.L., Houseman, E.A., Quamruzzaman, Q., Rahman, M., Mahiuddin, G., Christiani, D.C., 2007. Susceptibility to arsenic-induced skin lesions from polymorphisms in base excision repair genes. *Carcinogenesis* 28, 1520-1525.

Burstyn, I., Kromhout, H., Johansen, C., Langard, S., Kauppinen, T., Shaham, J., Ferro, G., Boffetta, P., 2007. Bladder cancer incidence and exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons among asphalt pavers. *Occup Environ Med* 64, 520-526.

Cabral, I., Rossit, A., Hamel, A., 1999. Polimorfismos em genes de biometabolismo e prevalência do alelo CYP2E1\*c2 em deficientes de G6PD assintomáticos: análises em uma população paraense. *Genet Molec Biol* 22 (suppl), 236-237.

Cai, L., You, N.-C.Y., Lu, H., Mu, L.-N., Lu, Q.-Y., Yu, S.-Z., Le, A.D., Marshall, J., Heber, D., Zhang, Z.-F., 2006. Dietary selenium intake, aldehyde dehydrogenase-2 and X-ray repair cross-complementing 1 genetic polymorphisms, and the risk of esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* 106, 2345-2354.

Caldecott, K.W., 2003. XRCC1 and DNA strand break repair. *DNA Repair* 2, 955-969.

Cappelli, E., Degan, P., Frosina, G., 2000. Comparative repair of the endogenous lesions 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxoG), uracil and abasic site by mammalian cell extracts: 8-oxoG is poorly repaired by human cell extracts. *Carcinogenesis* 21, 1135-1141.

Carlsten, C., Sagoo, G.S., Frodsham, A.J., Burke, W., Higgins, J.P.T., 2008. Glutathione S-transferase M1 (GSTM1) polymorphisms and lung cancer: A literature-based systematic HuGE review and meta-analysis. *Am J Epidemiol* 167, 759-774.

Celik, M., Donbak, L., Unal, F., Yüzbasloglu, D., Aksoy, H., Yilmaz, S., 2007. Cytogenetic damage in workers from a coal-fired power plant. *Mutat Res, Genet Toxicol Environ Mutagen* 627, 158-163.

Collins, A., 2004. The comet assay for DNA damage and repair. *Mol Biotechnol* 26, 249-261.

Chen, S.K., Hsieh, W. A., Tsai, M. H., Chen, C. C., Hong, A. I., Wei, Y. H. and Chang, W. P. , 2003. Age-associated decrease of oxidative repair enzymes, human 8-oxoguanine DNA glycosylases (hOgg1), in human aging. *J Radiat Res* 44, 31-35.

Cheng, J., Leng, S., Li, H., Huang, C., Niu, Y., Zhang, L., Liang, X., Lin, H., Zheng, Y., 2009. Suboptimal DNA repair capacity predisposes coke-oven workers to accumulate more chromosomal damages in peripheral lymphocytes. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 18, 987-993.

Chevillard, S., Radicella, J.P., Levalois, C., Lebeau, J., Poupon, M.F., Oudard, S., Dutrillaux, B., Boiteux, S., 1998. Mutations in OGG1, a gene involved in the repair of oxidative DNA damage, are found in human lung and kidney tumors. *Oncogene Res* 16, 3083-3086.

da Silva, J., de Freitas, T.R.O., Heuser, V., Marinho, J.R., Erdtmann, B., 2000. Genotoxicity biomonitoring in coal regions using wild rodent *Ctenomys torquatus* by Comet assay and micronucleus test. *Environ Mol Mutagen* 35, 270-278.

Dalal, N.S., Newman, J., Pack, D., Leonard, S., Vallyathan, V., 1995. Hydroxyl radical generation by coal mine dust: Possible implication to coal workers' pneumoconiosis (CWP). *Free Radic Biol Med* 18, 11-20.

David-Beabes, G.L., London, S.J., 2001. Genetic polymorphism of XRCC1 and lung cancer risk among African-Americans and Caucasians. *Lung Cancer* 34, 333-339.

de Abreu Gaspar, P., da Silva, J., Erdtmann, B., Pêgas Henriques, J.A., 2003. Genes de Susceptibilidade. In: editores, A. (Ed.) *Genética Toxicológica*, Porto Alegre, p. 424.

De Ruyck, K., Szaumkessel, M., De Rudder, I., Dehoorne, A., Vral, A., Claes, K., Velghe, A., Van Meerbeeck, J., Thierens, H., 2007. Polymorphisms in base-excision repair and nucleotide-excision repair genes in relation to lung cancer risk. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 631, 101-110.

De Ruyck, K., Van Eijkeren, M., Claes, K., Morthier, R., De Paepe, A., Vral, A., De Ridder, L., Thierens, H., 2005. Radiation-induced damage to normal tissues after radiotherapy in

patients treated for gynecologic tumors: Association with single nucleotide polymorphisms in XRCC1, XRCC3, and OGG1 genes and in vitro chromosomal radiosensitivity in lymphocytes. *International Journal of Radiation Oncology\*Biography\*Physics* 62, 1140-1149.

Decordier, I., Loock, K.V., Kirsch-Volders, M., 2010. Phenotyping for DNA repair capacity. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 705, 107-129.

Demircigil, G.C., Coskun, E., Vidinli, N., Erbay, Y., Yilmaz, M., Cimrin, A., Schins, R.P., Borm, P.J., Burgaz, S., 2010. Increased micronucleus frequencies in surrogate and target cells from workers exposed to crystalline silica-containing dust. *Mutagenesis* 25, 163-169.

Dhillon, V.S., Thomas, P., Iarmarcovai, G., Kirsch-Volders, M., Bonassi, S., Fenech, M., 2011. Genetic polymorphisms of genes involved in DNA repair and metabolism influence micronucleus frequencies in human peripheral blood lymphocytes. *Mutagenesis* 26, 33-42.

Dialyna, I.A., Miyakis, S., Georgatou, N., Spandidos, D.A., 2003. Genetic polymorphisms of CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 genes and lung cancer risk. *Oncol Rep* 10, 1829-1835.

Dianov, G.L., Sleeth, K.M., Dianova, I.I., Allinson, S.L., 2003. Repair of abasic sites in DNA. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 531, 157-163.

Dobiáš, L., Lehocká, Hana, Závacká, Ivona, Kůsová Jaromira, Adamus Tomas and Tomášková Hana 2006. The Carcinogenic Risk of Occupational Exposure to Quartz Dust: Biomonitoring Results. In: Cizmas, L.H., Tomas, A. (Eds.) *Environmental Health in Central and Eastern Europe*, vol. 1. Springer Netherlands, pp. 111-114.

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

Evans, M.D., Dizdaroglu, M., Cooke, M.S., 2004. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 567, 1-61.

Fenech, M., Chang, W.P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S., Zeiger, E., 2003. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutat Res, Genet Toxicol Environ Mutagen* 534, 65-75.

Fenech, M., Kirsch-Volders, M., Natarajan, A.T., Surrallés, J., Crott, J.W., Parry, J., Norppa, H., Eastmond, D.A., Tucker, J.D., Thomas, P., 2011. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis* 26, 125-132.

Fortini, P., Parlanti, E., Sidorkina, O.M., Laval, J., Dogliotti, E., 1999. The Type of DNA Glycosylase Determines the Base Excision Repair Pathway in Mammalian Cells. *J Biol Chem* 274, 15230-15236.

Freitas, T.P., Heuser, V.D., Tavares, P., Leffa, D.D., da Silva, G.A., Citadini-Zanette, V., Romão, P.R.T., Pinho, R.A., Streck, E.L., Andrade, V.M., 2009. Genotoxic Evaluation of Mikania laevigata Extract on DNA Damage Caused by Acute Coal Dust Exposure. *J Med Food* 12, 654-660.

Frosina, G., 2004. Commentary DNA Base Excision Repair Defects in Human Pathologies. *Free Radic Res* 38, 1037-1054.

Fujii-Kuriyama, Y., Mimura, J., 2005. Molecular mechanisms of AhR functions in the regulation of cytochrome P450 genes. *Biochem Biophys Res Commun* 338, 311-317.

Gammon, M.D., Santella, R.M., 2008. PAH, genetic susceptibility and breast cancer risk: An update from the Long Island Breast Cancer Study Project. *Eur J Cancer* 44, 636-640.

Garte, S., 2001. Metabolic Susceptibility Genes As Cancer Risk Factors Time for a Reassessment? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10, 1233-1237.

Garte, S., Taioli, E., Raimondi, S., Paracchini, V., Binkova, B., Sram, R.J., Kalina, I., Popov, T.A., Singh, R., Farmer, P.B., 2007. Effects of metabolic genotypes on intermediary biomarkers in subjects exposed to PAHS: Results from the EXPAH study. *Mutat Res, Fundam Mol Mech Mutagen* 620, 7-15.

Gibson, J., 1979. Coal - an introduction to its formation and properties. . In: Pitt GJ, M.G. (Ed.) *Coal and Modern Coal Processing: An Introduction* vol. 2. Academic Press., New York, pp. 1-25.

Gilliland, F.D., Li, Y.-F., Saxon, A., Diaz-Sanchez, D., 2004. Effect of glutathione-S-transferase M1 and P1 genotypes on xenobiotic enhancement of allergic responses: randomised, placebo-controlled crossover study. *The Lancet* 363, 119-125.

Godderis, L., Aka, P., Mateuca, R., Kirsch-Volders, M., Lison, D., Veulemans, H., 2006. Dose-dependent influence of genetic polymorphisms on DNA damage induced by styrene oxide, ethylene oxide and gamma-radiation. *Toxicology* 219, 220-229.

Goode, E., Ulrich, C.M., Potter, J.D., 2002. Polymorphisms in DNA Repair Genes and Associations with Cancer Risk1. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* Vol. 11, 1513-1530.

Grandjean, P., 1995. Biomarkers in epidemiology. *Clin Chem* 41, 1800-1803.

Grégio D'Arce, L.P., Cólus, I.M.d.S., 2000. Cytogenetic and molecular biomonitoring of agricultural workers exposed to pesticides in Brazil. *Teratog Carcinog Mutagen* 20, 161-170.

Grover, P., Rekhadevi, P.V., Danadevi, K., Vuyyuri, S.B., Mahboob, M., Rahman, M.F., 2010. Genotoxicity evaluation in workers occupationally exposed to lead. *Int J Hyg Environ Health* 213, 99-106.

Hartmann, A., Agurell, E., Beevers, C., Brendler-Schwaab, S., Burlinson, B., Clay, P., Collins, A., Smith, A., Speit, G., Thybaud, V., Tice, R.R., 2003. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. *Mutagenesis* 18, 45-51.

Hosgood, H.D., Berndt, S.I., Lan, Q., 2007. GST genotypes and lung cancer susceptibility in Asian populations with indoor air pollution exposures: A meta-analysis. *Mutat Res Rev Mutat Res* 636, 134-143.

Hoyos-Giraldo, L.S., Carvajal, S., Cajas-Salazar, N., Ruíz, M., Sánchez-Gómez, A., 2009. Chromosome aberrations in workers exposed to organic solvents: Influence of polymorphisms in xenobiotic-metabolism and DNA repair genes. *Mutat Res* 666, 8-15.

Huang, Y.S., Li, L.G., Yu, L., 2009. XRCC1 Arg399Gln, Arg194Trp and Arg280His polymorphisms in breast cancer risk: a meta-analysis. *Mutagenesis* 24, 331-339.

Hung, R.J., Hall, J., Brennan, P., Boffetta, P., 2005. Genetic polymorphisms in the base excision repair pathway and cancer risk: A HuGE review. *Am J Epidemiol* 162, 925-942.

Iarmarcovai, G., Botta, A., Orsiere, T., 2007. Micronuclei and genetic polymorphisms: from exposure to susceptibility. *Ann Biol Clin (Paris)* 65, 357-363.

Indulski, J.A., Lutz, W., 2000. Metabolic genotype in relation to individual susceptibility to environmental carcinogens. *Int Arch Occup Environ Health* 73, 71-85.

Irons, R.M.A., Quick, W., Whitehouse, M., Wardle, D., Miles, N., 2000. The fate of trace elements in pulverised fuel (PF) combustion systems. vol. R193. PowerGen UK plc, CRE Group Ltd, University of Nottingham.

Ishikawa, H., Yamamoto, H., Tian, Y., Kawano, M., Yamauchi, T., Yokoyama, K., 2003. Effects of ALDH2 gene polymorphisms and alcohol-drinking behavior on micronuclei frequency in non-smokers. *Mutat Res* 541, 71-80.

Janssen, K., Schlink, K., Götte, W., Hippler, B., Kaina, B., Oesch, F., 2001. DNA repair activity of 8-oxoguanine DNA glycosylase 1 (OGG1) in human lymphocytes is not dependent on genetic polymorphism Ser326/Cys326. *Mutation Research/DNA Repair* 486, 207-216.

Ji, F., Wang, W., Xia, Z.-L., Zheng, Y.-J., Qiu, Y.-L., Wu, F., Miao, W.-B., Jin, R.-F., Qian, J., Jin, L., Zhu, Y.-L., Christiani, D.C., 2010. Prevalence and persistence of chromosomal damage and susceptible genotypes of metabolic and DNA repair genes in Chinese vinyl chloride-exposed workers. *Carcinogenesis* 31, 648-653.

Jiang, S., Yu, L., Cheng, J., Leng, S., Dai, Y., Zhang, Y., Niu, Y., Yan, H., Qu, W., Zhang, C., Zhang, K., Yang, R., Zhou, L., Zheng, Y., 2010. Genomic damages in peripheral blood lymphocytes and association with polymorphisms of three glutathione S-transferases in workers exposed to formaldehyde. *Mutat Res* 695, 9-15.

José Zocche, J., Dimer Leffa, D., Paganini Damiani, A., Carvalho, F., Ávila Mendonça, R., dos Santos, C.E.I., Appel Bouffleur, L., Ferraz Dias, J., de Andrade, V.M., 2010. Heavy metals and DNA damage in blood cells of insectivore bats in coal mining areas of Catarinense coal basin, Brazil. *Environ Res* 110, 684-691.

Kawajiri, K., Nakachi, K., Imai, K., Yoshii, A., Shinoda, N., Watanabe, J., 1990. Identification of genetically high risk individuals to lung cancer by DNA polymorphisms of the cytochrome P450 OIA1 gene. *FEBS Lett* 263, 131-133.



Kelly, F.J., Sandström, T., 2004. Air pollution, oxidative stress, and allergic response. *The Lancet* 363, 95-96.

Kirsch-Volders, M., Mateuca, R.A., Roelants, M., Tremp, A., Zeiger, E., Bonassi, S., Holland, N., Chang, W.P., Aka, P.V., Deboeck, M., Godderis, L., Haufroid, V., Ishikawa, H., Laffon, B., Marcos, R., Migliore, L., Norppa, H., Teixeira, J.P., Zijno, A., Fenech, M., 2006. The effects of GSTM1 and GSTT1 polymorphisms on micronucleus frequencies in human lymphocytes in vivo. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15, 1038-1042.

Klungland, A., Bjelland, S., 2007. Oxidative damage to purines in DNA: Role of mammalian Ogg1. *DNA Repair* 6, 481-488.

Klungland, A., Rosewell, I., Hollenbach, S., Larsen, E., Daly, G., Epe, B., Seeberg, E., Lindahl, T. and Barnes, D.E., 1999. Accumulation of pre-mutagenic DNA lesions in mice defective in removal of oxidative base damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 13300-13305

Knaapen, A.M., Borm, P.J., Albrecht, C., Schins, R.P., 2004. Inhaled particles and lung cancer. Part A: Mechanisms. *Int J Cancer* 109, 799-809.

Kobus, K., Turner, J., Priestley, B., Dreosti, I., 1993. A comparison of the 8-hydroxydeoxyguanosine and micronucleus techniques for the assessment of X-ray and UV induced genotoxicity. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 80, 249.

Kubiak, R., Belowski, J., Szczeklik, J., Smolik, E., Mielzynska, D., Baj, M., Szczesna, A., 1999. Biomarkers of carcinogenesis in humans exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 445, 175-180.

Kuljucka-Rabb, T., Nylund, L., Vaaranrinta, R., Savela, K., Mutanen, P., Veidebaum, T., Sorsa, M., Rannug, A., Peltonen, K., 2002. The effect of relevant genotypes on PAH exposure-related biomarkers. *J Expo Anal Environ Epidemiol* 12, 81-91.

Kuznetsov, N., Koval, V., Fedorova, O., 2010. Mechanism of recognition and repair of damaged DNA by human 8-oxoguanine DNA glycosylase hOGG1. *Biochemistry (Moscow)* 76, 118-130.

Kvitko, Nunes JC, Weimer TA, Salzano FM, MH., H., 2000. Cytochrome P4501A1 polymorphisms in South American Indians. *Hum Biol* 72, 1039-1043.

Landi, S., 2000. Mammalian class theta GST and differential susceptibility to carcinogens: a review. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 463, 247-283.

Lao, T., Gu, W., Huang, Q., 2008. A meta-analysis on XRCC1 R399Q and R194W polymorphisms, smoking and bladder cancer risk. *Mutagenesis* 23, 523-532.

Leng, S., Cheng, J., Zhang, L., Niu, Y., Dai, Y., Pan, Z., Li, B., He, F., Zheng, Y., 2005. The Association of XRCC1 Haplotypes and Chromosomal Damage Levels in Peripheral Blood Lymphocyte among Coke-Oven Workers. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 14, 1295-1301.

Leng, S., Dai, Y., Niu, Y., Pan, Z., Li, X., Cheng, J., He, F., Zheng, Y., 2004. Effects of Genetic Polymorphisms of Metabolic Enzymes on Cytokinesis-Block Micronucleus in Peripheral Blood Lymphocyte among Coke-Oven Workers. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 13, 1631-1639.

León-Mejía, G., Espitia-Pérez, L., Hoyos-Giraldo, L.S., Da Silva, J., Hartmann, A., Henriques, J.A.P., Quintana, M., 2011. Assessment of DNA damage in coal open-cast mining workers using the cytokinesis-blocked micronucleus test and the comet assay. *Sci Total Environ* 409, 686-691.

León, G., Pérez, L.E., Linares, J.C., Hartmann, A., Quintana, M., 2007. Genotoxic effects in wild rodents (*Rattus rattus* and *Mus musculus*) in an open coal mining area. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 630, 42-49.

Li, Z., Wu, Y., Zhao, Y., Wang, L., Zhu, H., Qin, L., Feng, F., Wang, W., Wu, Y., 2011. Analysis of coal tar pitch and smoke extract components and their cytotoxicity on human bronchial epithelial cells. *J Hazard Mater* 186, 1277-1282.

Liu, G., Niu, Z., Van Niekerk, D., Xue, J., Zheng, L., 2008. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from coal combustion: emissions, analysis, and toxicology. *Rev Environ Contam Toxicol* 192, 1-28.

Liu, H.-H., Lin, M.-H., Chan, C.-I., Chen, H.-L., 2010. Oxidative damage in foundry workers occupationally co-exposed to PAHs and metals. *Int J Hyg Environ Health* 213, 93-98.

Lum, A., Le Marchand, L., 1998. A simple mouthwash method for obtaining genomic DNA in molecular epidemiological studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 7, 719-724.

Lynch, A.M., Sasaki, J.C., Elespuru, R., Jacobson-Kram, D., Thybaud, V., De Boeck, M., Aardema, M.J., Aubrecht, J., Benz, R.D., Dertinger, S.D., Douglas, G.R., White, P.A., Escobar, P.A., Fornace, A., Honma, M., Naven, R.T., Rusling, J.F., Schiestl, R.H., Walmsley, R.M., Yamamura, E., van Benthem, J., Kim, J.H., 2011. New and Emerging Technologies for Genetic Toxicity Testing. *Environ Mol Mutagen* 52, 19.

Lloyd, D.R., Carmichael, P.L., Phillips, D.H., 1998. Comparison of the Formation of 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine and Single- and Double-Strand Breaks in DNA Mediated by Fenton Reactions. *Chem Res Toxicol* 11, 420-427.

Marcon, F., Andreoli, C., Rossi, S., Verdina, A., Galati, R., Crebelli, R., 2003. Assessment of individual sensitivity to ionizing radiation and DNA repair efficiency in a healthy population. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 541, 1-8.

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

Marston, C.P., Pereira, C., Ferguson, J., Fischer, K., Hedstrom, O., Dashwood, W.-M., Baird, W.M., 2001. Effect of a complex environmental mixture from coal tar containing polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) on the tumor initiation, PAH-DNA binding and metabolic activation of carcinogenic PAH in mouse epidermis. *Carcinogenesis* 22, 1077-1086.

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

Mateuca, R., Aka, P.V., De Boeck, M., Hauspie, R., Kirsch-Volders, M., Lison, D., 2005. Influence of hOGG1, XRCC1 and XRCC3 genotypes on biomarkers of genotoxicity in workers exposed to cobalt or hard metal dusts. *Toxicol Lett* 156, 277-288.

Mateuca, R.A., Roelants, M., Iarmarcovai, G., Aka, P.V., Godderis, L., Tremp, A., Bonassi, S., Fenech, M., Bergamini, J.-L., Kirsch-Volders, M., 2008. hOGG1326, XRCC1399 and XRCC3241 polymorphisms influence micronucleus frequencies in human lymphocytes in vivo. *Mutagenesis* 23, 35-41.

Minozzo, R., Deimling, L.I., Santos-Mello, R., 2010. Cytokinesis-blocked micronucleus cytome and comet assays in peripheral blood lymphocytes of workers exposed to lead considering folate and vitamin B12 status. *Mutat Res* 697, 24-32.

Moullan, N., Cox, D.G., Angillet, S., Romestaing, P., Girard, J.-P., Hall, J., 2003. Polymorphisms in the DNA Repair Gene XRCC1, Breast Cancer Risk, and Response to Radiotherapy. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 12, 1168-1174.

Muller, P., Stock, T., Bauer, S., Wolff, I., 2002. Genotoxicological characterisation of complex mixtures. Genotoxic effects of a complex mixture of perhalogenated hydrocarbons. *Mutat Res* 515, 99-109.

Nelson, H.H., Kelsey, K.T., Mott, L.A., Karagas, M.R., 2002. The XRCC1 Arg399Gln Polymorphism, Sunburn, and Non-melanoma Skin Cancer. *Cancer Res* 62, 152-155.

Neri, M., Filiberti, R., Taioli, E., Garte, S., Paracchini, V., Bolognesi, C., Canessa, P.A., Fontana, V., Ivaldi, G.P., Verna, A., Bonassi, S., Puntoni, R., 2005. Pleural malignant mesothelioma, genetic susceptibility and asbestos exposure. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 592, 36-44.

NIOSH, 1991. National Institute for Occupational Safety and Health - Registry of toxic effects of chemical substances: Coal, ground bituminous. . In: U.S. Department of Health and Human Services, P.H.S., Centers for Disease Control, National Institute for Occupational Safety and Health, Division of Standards Development and Technology Transfer, Technical Information Branch. (Ed.), Cincinnati, OH.

Norppa, H., 2004. Cytogenetic biomarkers and genetic polymorphisms. *Toxicol Lett* 149, 309-334.

Obtulowicz, T., Swoboda, M., Speina, E., Gackowski, D., Rozalski, R., Siomek, A., Janik, J., Janowska, B., CieÅla, J.M., Jawien, A., Banaszkiwicz, Z., Guz, J., Dziaman, T., Szpila, A., Olinski, R., Tudek, B., 2010. Oxidative stress and 8-oxoguanine repair are enhanced in colon adenoma and carcinoma patients. *Mutagenesis* 25, 463-471.

Pande, M., Amos, C.I., Osterwisch, D.R., Chen, J.Y., Lynch, P.M., Broaddus, R., Frazier, M.L., 2008. Genetic variation in genes for the xenobiotic-metabolizing enzymes CYP1A1, EPHX1, GSTM1, GSTT1, and GSTP1 and susceptibility to colorectal cancer in Lynch syndrome. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 17, 2393-2401.

Parl, F.F., 2005. Glutathione S-transferase genotypes and cancer risk. *Cancer Lett* 221, 123-129.

Pastor, S., 2002. Biomonitorización Citogenética de cuatro poblaciones agrícolas europeas, expuestas a plaguicidas mediante el ensayo de Micronúcleos. Departamento de Genética y Microbiología, Grupo de Mutagénesis Facultad de Ciencias vol. Tesis de doctorado. . Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona- España, p. 107.

Pavanello, S., Pulliero, A., Siwinska, E., Mielzynska, D., Clonfero, E., 2005. Reduced nucleotide excision repair and GSTM1-null genotypes influence anti-B[a]PDE-DNA adduct levels in mononuclear white blood cells of highly PAH-exposed coke oven workers. *Carcinogenesis* 26, 169-175.

Pemble, K.R., Schroeder, S.R., Spencer, D.J., Meyer, E., Hallier, H.M., Bolt, B.K., Taylor, J.B., 1994. Human glutathione S-transferase theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. *Biochem J* 300 271-276. .

Peralba, M.C.R., 1990. Caracterização química dos hidrocarbonetos de betumes de carvões sul-brasileiros. Instituto de Física e Química de São Carlos, vol. Dissertação de Doutorado USP, São Carlos, p. 126.

Pérez-Cadahía, B., Laffon, B., Valdiglesias, V., Pásaro, E., Méndez, J., 2008. Cytogenetic effects induced by Prestige oil on human populations: The role of polymorphisms in genes involved in metabolism and DNA repair. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 653, 117-123.

Pinarbasi, H., Silig, Y., Cetinkaya, O., Seyfikli, Z., Pinarbasi, E., 2003. Strong association between the GSTM1-null genotype and lung cancer in a Turkish population. *Cancer Genet Cytogenet* 146, 125-129.

Qiu, L., Leng, S., Wang, Z., Dai, Y., Zheng, Y., 2007. Path analysis of biomarkers of exposure and early biological effects among coke-oven workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 16, 1193-1199.

Ratnasinghe, D., Yao, S.-X., Tangrea, J.A., Qiao, Y.-L., Andersen, M.R., Barrett, M.J., Giffen, C.A., Erozan, Y., Tockman, M.S., Taylor, P.R., 2001. Polymorphisms of the DNA Repair Gene XRCC1 and Lung Cancer Risk. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 10, 119-123.

Ratnasinghe, D.L., Yao, S.X., Forman, M., Qiao, Y.L., Andersen, M.R., Giffen, C.A., Erozan, Y., Tockman, M.S., Taylor, P.R., 2003. Gene-environment interactions between the codon 194 polymorphism of XRCC1 and antioxidants influence lung cancer risk. *Anticancer Res* 23, 627-632.

Ratnasinghe, L.D., Abnet, C., Qiao, Y.-L., Modali, R., Stolzenberg-Solomon, R., Dong, Z.-W., Dawsey, S.M., Mark, S.D., Taylor, P.R., 2004. Polymorphisms of XRCC1 and risk of esophageal and gastric cardia cancer. *Cancer Lett* 216, 157-164.

Record, I.R., Jannes, M., 2000. Iron, [alpha]-tocopherol, oxidative damage and micronucleus formation in rat splenocytes. *Cancer Lett* 160, 125-131.

Repetto, M., Kuhn Repetto, G., 2009. *Toxicología Médica*. Ediciones Díaz de Santos.

Reynolds, L., Jones, T.P., BeruBe, K.A., Wise, H., Richards, R., 2003. Toxicity of airborne dust generated by opencast coal mining. *Mineral Mag* 67, 141-152.

Rohr, P., 2008. Influência de polimorfismos em genes de reparo no risco ocupacional de Viticultores do Rio Grande do Sul Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular vol. Master. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Rohr, P., da Silva, J., Erdtmann, B., Saffi, J., Guecheva, T.N., Antonio Pegas Henriques, J., Kvitko, K., 2010. BER gene polymorphisms (OGG1 Ser326Cys and XRCC1 Arg194Trp) and modulation of DNA damage due to pesticides exposure. *Environ Mol Mutagen* 52, 20-27.

Rossit, A.R.B., Cabral, I.R., Hackel, C., da Silva, R.d.C.M.A., Froes, N.D.T.C., Abdel-Rahman, S.Z., 2002. Polymorphisms in the DNA repair gene XRCC1 and susceptibility to alcoholic liver cirrhosis in older Southeastern Brazilians. *Cancer Lett* 180, 173-182.

Saffi, J., Henriques, J.A.P., 2003. Reparação de DNA em Células Eucariotas. In: Alcance (Ed.) *Genética Toxicológica*. Alcance, Porto Alegre, p. 422.

Salama, S.A., Sierra-Torres, C.H., Oh, H.Y., Hamada, F.A., Au, W.W., 2001. Variant metabolizing gene alleles determine the genotoxicity of benzo[a]pyrene. *Environ Mol Mutagen* 37, 17-26.

Saurabh, K., Sharma, A., Yadav, S., Parmar, D., 2010. Polycyclic aromatic hydrocarbon metabolizing cytochrome P450s in freshly prepared uncultured rat blood lymphocytes. *Biochem Pharmacol* 79, 1182-1188.

Schins, R., Borm, P., 1999. Mechanisms and Mediators in Coal Dust Induced Toxicity: A Review. *Ann Occup Hyg* 32, 7 - 33.

Sellappa, S., Prathyumnar, S., Joseph, S., Keyan, K.S., Balakrishnan, M., Sasikala, K., 2009. XRCC1399 and hOGG1326 polymorphisms and frequencies of micronuclei, comet and chromosomal aberrations among tobacco chewers: a South Indian population study. *Asian Pac J Cancer Prev* 10, 1057-1062.

Shen, H., Spitz, M.R., Qiao, Y., Guo, Z., Wang, L.-E., Bosken, C.H., Amos, C.I., Wei, Q., 2003. Smoking, DNA repair capacity and risk of nonsmall cell lung cancer. *Int J Cancer* 107, 84-88.



Shen, M.R., Jones, I.M., Mohrenweiser, H., 1998. Nonconservative Amino Acid Substitution Variants Exist at Polymorphic Frequency in DNA Repair Genes in Healthy Humans. *Cancer Res* 58, 604-608.

Shen, Y.P., Li, D.K., Wu, J.Q., Zhang, Z.B., Gao, E.S., 2006. Joint effects of the CYP1A1 MspI, ER alpha PvuII, and ER alpha XbaI polymorphisms on the risk of breast cancer: Results from a population-based case-control study in Shanghai, China. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 15, 342-347.

Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175, 184-191.

Smith, G.B.J., Harper, P.A., Wong, J.M.Y., Lam, M.S.M., Reid, K.R., Petsikas, D., Massey, T.E., 2001. Human Lung Microsomal Cytochrome P4501A1 (CYP1A1) Activities. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 10, 839-853.

Smith, T.R., Miller, M.S., Lohman, K., Lange, E.M., Case, L.D., Mohrenweiser, H.W., Hu, J.J., 2003. Polymorphisms of XRCC1 and XRCC3 genes and susceptibility to breast cancer. *Cancer Lett* 190, 183-190.

Soukup, D., Buck, Brenda, Goossens, Dirk, Teng, Yuanxin and Baron, Dirk 2007. Chapter 8: Mineralogical Composition. Mineralogical composition of soil samples in the Nellis dune recreation area.

Sram, R.J., Beskid, O., Binkova, B., Chvatalova, I., Lnenickova, Z., Milcova, A., Solansky, I., Tulupova, E., Bavorova, H., Ocadlikova, D., Farmer, P.B., 2007. Chromosomal aberrations in environmentally exposed population in relation to metabolic and DNA repair genes polymorphisms. *Mutat Res, Fundam Mol Mech Mutagen* 620, 22-33.

Stern, M.C., Umbach, D.M., van Gils, C.H., Lunn, R.M., Taylor, J.A., 2001. DNA Repair Gene XRCC1 Polymorphisms, Smoking, and Bladder Cancer Risk. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 10, 125-131.

Sterpone, S., Cozzi, R., 2010. Influence of XRCC1 Genetic Polymorphisms on Ionizing Radiation-Induced DNA Damage and Repair. *Journal of Nucleic Acids*.

Stucki, M., Pascucci, B., Parlanti, E., Fortini, P., Wilson, S., Hubscher, U., Dogliotti, E., 1998. Mammalian base excision repair by DNA polymerase delta and epsilon. *Oncogene Res* 17, 835-843.

Tarantini, A., Maitre, A., Lefebvre, E., Marques, M., Rajhi, A., Douki, T., 2011a. Polycyclic aromatic hydrocarbons in binary mixtures modulate the efficiency of benzo[a]pyrene to form DNA adducts in human cells. *Toxicology* 279, 36-44.

Tarantini, A., Maître, A., Lefèbvre, E., Marques, M., Rajhi, A., Douki, T., 2011b. Polycyclic aromatic hydrocarbons in binary mixtures modulate the efficiency of benzo[a]pyrene to form DNA adducts in human cells. *Toxicology* 279, 36-44.

Tarng, D.-C., Tsai, T.-J., Chen, W.-T., Liu, T.-Y., Wei, Y.-H., 2001. Effect of Human OGG1 1245C→G Gene Polymorphism on 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine Levels of Leukocyte DNA among Patients Undergoing Chronic Hemodialysis. *J Am Soc Nephrol* 12, 2338-2347.

Thompson, L.H., West, M.G., 2000. XRCC1 keeps DNA from getting stranded. *Mutation Research/DNA Repair* 459, 1-18.

Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F., 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 35, 206-221.

Tuimala, J., Szekely, G., Gundy, S., Hirvonen, A., Norppa, H., 2002. Genetic polymorphisms of DNA repair and xenobiotic-metabolizing enzymes: role in mutagen sensitivity. *Carcinogenesis* 23, 1003-1008.

Ulker, O.C., Ustundag, A., Duydu, Y., Yucesoy, B., Karakaya, A., 2008. Cytogenetic monitoring of coal workers and patients with coal workers' pneumoconiosis in Turkey. *Environ Mol Mutagen* 49, 232-237.

UPME, 2005. Plan de expansión de referencia generación - transmisión (Versión preliminar). . Unidad Minero Energética Vol. 2019. , 148 p.

Vidal, A.E., Boiteux, S., Hickson, I.D., Radicella, J.P., 2001. XRCC1 coordinates the initial and late stages of DNA abasic site repair through protein-protein interactions. *EMBO J* 20, 6530-6539.

Villarini, M., Moretti, M., Fatigoni, C., Agea, E., Dominici, L., Mattioli, A., Volpi, R., Pasquini, R., 2008. Evaluation of Primary DNA Damage, Cytogenetic Biomarkers and Genetic Polymorphisms for CYP1A1 and GSTM1 in Road Tunnel Construction Workers. *J Toxicol Environ Health A* 71, 1430 - 1439.

Villela I, Lau A, Silveira J, Pra D, Rolla HC, JD, S., 2003. Bioensaios para o Monitoramento de Genotoxicidade Ambiental. In: Silva J., E.B., Henriques J. P. A. (organizadores) . (Ed.) *Genética Toxicológica*. Ed. Alcance., Porto Alegre, pp. pp 147-163. .

Vora, J., 2010. Dust dispersion modeling for Open-cast mines. Department of mining engineering vol. Bachelor of Technology in Mining Engineering. National Institute of Technology, Rourkela, Orissa-India, p. 46.

Wang, Q., Ji, F., Sun, Y., Qiu, Y.-L., Wang, W., Wu, F., Miao, W.-b., Li, Y., Brandt-Rauf, P.W., Xia, Z.-l., 2010a. Genetic polymorphisms of XRCC1, HOGG1 and MGMT and micronucleus occurrence in Chinese vinyl chloride-exposed workers. *Carcinogenesis* 31, 1068-1073.

Wang, Q., Wang, A.-h., Tan, H.-s., Feng, N.-n., Ye, Y.-j., Feng, X.-q., Liu, G., Zheng, Y.-x., Xia, Z.-l., 2010b. Genetic polymorphisms of DNA repair genes and chromosomal damage in workers exposed to 1,3-butadiene. *Carcinogenesis* 31, 858-863.

Wang, Y., Yang, H., Li, H., Li, L., Wang, H., Liu, C.e., Zheng, Y., 2009. Association between X-ray repair cross complementing group 1 codon 399 and 194 polymorphisms and lung cancer risk: A meta-analysis. *Cancer Lett* 285, 134-140.

Wang, Y., Yang, H., Li, L., Wang, H., 2010c. Glutathione S-transferase T1 gene deletion polymorphism and lung cancer risk in Chinese population: A meta-analysis. *Cancer Epidemiol* 34, 593-597.

Weiss, J.M., Goode, E.L., Ladiges, W.C., Ulrich, C.M., 2005. Polymorphic variation in hOGG1 and risk of cancer: A review of the functional and epidemiologic literature. *Mol Carcinog* 42, 127-141.

White, P.A., 2002a. The genotoxicity of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in complex mixtures. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 515, 85-98.

White, P.A., 2002b. The genotoxicity of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in complex mixtures. *Mutat Res Rev Mutat Res* 515, 85-98.

Xi, T., Jones, I.M., Mohrenweiser, H.W., 2004. Many amino acid substitution variants identified in DNA repair genes during human population screenings are predicted to impact protein function. *Genomics* 83, 970-979.

Yamane, A., Kohno, T., Ito, K., Sunaga, N., Aoki, K., Yoshimura, K., Murakami, H., Nojima, Y., Yokota, J., 2004. Differential ability of polymorphic OGG1 proteins to suppress mutagenesis induced by 8-hydroxyguanine in human cell in vivo. *Carcinogenesis* 25, 1689-1694.

Yang, R.S.H., Hong, H.L., Boorman, G.A., 1989. Toxicology of chemical mixtures: experimental approaches, underlying concepts, and some results. *Toxicol Lett* 49, 183-197.

Yucesoy, B., Johnson, V.J., Kashon, M.L., Fluharty, K., Vallyathan, V., Luster, M.I., 2005. Lack of association between antioxidant gene polymorphisms and progressive massive fibrosis in coal miners. *Thorax* 60, 492-495.

Zahrewski, S., 1991. *Principles of Environmental Toxicology* (Zahrewski SF, ed.). American Chemical Society, Washington, 270 pp.

Zhai, R., Liu, G., Ge, X., Yang, C., Huang, C., Wu, C., Christiani, D.C., 2002. Genetic Polymorphisms of MnSOD, GSTM1, GSTT1, and OGG1 in Coal Workers' Pneumoconiosis. *J Occup Environ Med* 44, 372-377.

Zhan, P., Wang, J., Qian, Q.A., Wei, S.Z., Qiu, L.X., Yu, L.K., Song, Y., 2010. CYP1A1 Msp1 and Exon7 Gene Polymorphisms and Lung Cancer Risk An Updated Meta-Analysis of 50 Case-Control Studies. *J Thorac Oncol* 5, S405-S405.

Zhang, Q., Dai, J., Ali, A., Chen, L., Huang, X., 2002. Roles of bioavailable iron and calcium in coal dust-induced oxidative stress: possible implications in coal workers' lung disease. *Free Radic Res* 36, 285-294.

Zhuo, W.L., Zhang, Y.S., Wang, Y., Zhuo, X.L., Zhu, B., Cai, L., Chen, Z.T., 2009. Association Studies of CYP1A1 and GSTM1 Polymorphisms with Esophageal Cancer Risk: Evidence-based Meta-analyses. *Arch Med Res* 40, 169-179.

Zienolddiny, S., Campa, D., Lind, H., Ryberg, D., Skaug, V., Stangeland, L., Phillips, D.H., Canzian, F., Haugen, A., 2006. Polymorphisms of DNA repair genes and risk of non-small cell lung cancer. *Carcinogenesis* 27, 560-567.

Zijno, A., Verdina, A., Galati, R., Leopardi, P., Marcon, F., Andreoli, C., Rossi, S., Crebelli, R., 2006. Influence of DNA repair polymorphisms on biomarkers of genotoxic damage in peripheral lymphocytes of healthy subjects. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 600, 184-192.

**A**NEXOS

## **ANEXO II - TERMO DE CONSENTIMIENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

### **CONSENTIMIENTO INFORMADO**

#### **EVALUACIÓN DE LA EXPOSICIÓN, EFECTOS GENOTÓXICOS Y**

#### **SUSCEPTIBILIDAD GENÉTICA EN UNA POBLACIÓN OCUPACIONALMENTE**

#### **EXPUESTA A RESIDUOS DE MINERÍA DE CARBÓN**

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

#### **OBJETIVO Y PROPÓSITO DEL ESTUDIO**

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

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



Conozco además, que en el mismo serán seleccionados 100 trabajadores expuestos a residuos de minería carbón y 100 trabajadores del yacimiento con trabajo de oficina sin antecedentes de exposición tomado como grupo control, con el fin de contrastar en el análisis de los resultados que individuos son más susceptibles a la exposición ocupacional de residuos de minería carbón.

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

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

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

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

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

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

Tengo claro que no se me proveerá ninguna compensación económica.

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

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

**YO ENTIENDO QUE:**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

---

Nombre del Participante

---

Firma del Participante

---

Nombre del Testigo

---

Firma del Testigo

---

**MILTON QUINTANA SOSA**

Director del proyecto

## ANEXO III – QUESTIONÁRIO INDIVIDUAL

### CUESTIONARIO INDIVIDUAL

CODIGO \_\_\_\_\_

1. Edad \_\_\_\_\_ en años:

2. Fecha de nacimiento \_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

3. Dirección: \_\_\_\_\_

4. Teléfono fijo \_\_\_\_\_ Teléfono celular \_\_\_\_\_

5. Grupo étnico: ( ) Negro ( ) Chino ( ) Japonés ( ) Indígena ( ) Mestizo ( )

6. Número de hijos: \_\_\_\_\_

7. Empleo anterior: \_\_\_\_\_

8. Función que ejercía: \_\_\_\_\_

9. ¿En su empleo anterior, estuvo expuesto a algunas de estas sustancias? (Informe el tiempo de exposición):

( ) Derivados de petróleo \_\_\_\_\_ ( ) Tintas/Colorantes \_\_\_\_\_ ( ) Solventes \_\_\_\_\_

( ) Otros residuos de minería \_\_\_\_\_ ( ) Mercurio/Vapores \_\_\_\_\_ ( ) Polvo de carbón \_\_\_\_\_

Otras sustancias químicas ¿Cuáles? \_\_\_\_\_

10. Función actual en la cadena de producción: \_\_\_\_\_

11. Tiempo de servicio: \_\_\_\_\_

12. ¿En su empleo actual, ya se expuso a alguna de estas sustancias? (Informe el tiempo de exposición):

( ) Derivados de petróleo \_\_\_\_\_ ( ) Emisiones Diesel \_\_\_\_\_ ( ) Solventes \_\_\_\_\_

( ) Residuos de minería de carbón \_\_\_\_\_ ( ) Mercurio/Otros metales pesados \_\_\_\_\_

Otras sustancias químicas - ¿Cuáles? \_\_\_\_\_

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

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

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

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

32. Caso de cáncer en la familia: ( ) Si ( ) No – Grado de parentesco: \_\_\_\_\_

33. Tipos de cáncer: ( ) Piel ( ) Mama ( ) Leucemia ( ) Esófago  
Otros \_\_\_\_\_