

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

**AVALIAÇÃO DO RISCO OCUPACIONAL EM
TRABALHADORES DE MINAS DE CARVÃO DE
CANDIOTA (RIO GRANDE DO SUL)**

Paula Rohr

Tese submetida ao Programa de Pós
Graduação em Genética e Biologia
Molecular da UFRGS como requisito
parcial para a obtenção do grau de
Doutor em Ciências.

Orientação: Prof. Dra. Kátia Kvitko

Co-orientação: Prof. Dra. Juliana da Silva

Porto Alegre, abril de 2012

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunogenética do Departamento de Genética do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) em colaboração com o Laboratório de Implantação Iônica do Instituto de Física da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), com o Laboratório de Genética Toxicológica e Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Veterinário da Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), com o Laboratório de Estresse Oxidativo e Antioxidante do Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul (UCS), e foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

AGRADECIMENTOS

Quando comecei o doutorado, pensava que seria tudo tão simples, que os 4 anos seriam bastante tempo para todo o meu projeto. Passados estes 4 anos, hoje, vejo que este tempo nem foi tanto assim. Nem tudo saiu como eu imaginava, tocar o projeto não foi tão fácil assim. Cada vez que encontrava solução para algum problema, prontamente, algum outro aparecia. Mas cheguei ao final, o que com certeza, só foi possível com o apoio e incentivo de muitas pessoas, às quais não posso deixar de agradecer:

Em primeiro lugar tenho que agradecer a todos que fizeram parte da amostra, tanto os indivíduos expostos, o principal motivo deste estudo, como também os indivíduos não expostos, sem os quais este trabalho não seria possível;

As coletas dos trabalhadores só foram possíveis através do Sindicato dos Trabalhadores da Indústria da Extração e Beneficiamento e Comércio de Minerais de Candiota, nas pessoas do Presidente, Wagner Lopes Pinto, do diretor, Edson Budó, como também do Seu João. Muito obrigado por terem acreditado em mim e no projeto, como também, por abrirem espaço para a realização das coletas, além de facilitarem acesso aos trabalhadores;

A todo o pessoal da Secretaria da Saúde de Candiota, desde o secretário, o Sr. Anselmo Camilo, a Enfermeira Ariadne Costa, e as técnicas de enfermagem e o motorista, eu agradeço por todo o apoio prático nas coletas, e também por toda ajuda no contato com os indivíduos não expostos ocupacionalmente;

Tenho que agradecer à Universidade Regional da Campanha, URCAMP, pela acolhida durante a realização das coletas. À Prof. Noemia Tavares, a então Diretora do Centro de Ciências da Saúde, e ao Prof. Mário Mansur Filho, o Pró-Reitor de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão, por terem aberto as portas da instituição para a utilização da estrutura, Cristemar Vinholes, mais conhecida por Tina, a técnica do laboratório, que desde o primeiro dia nos fez sentir em casa (e

como, ne Fê R.), a todo o pessoal do Centro de Saúde, por todo o apoio e incentivo sempre, e claro aos ex-alunos do curso de Farmácia, hoje já formados, Lucas Machado e Marla Brum, por serem os primeiros coletadores. A todos estes muito obrigada;

À Ana Paula Simões Menezes, por tudo, pelas risadas e parcerias, além de toda a ajuda nas coletas, mas principalmente por abrir as portas da tua casa desde que nos conhecemos, mesmo quando mal nos conhecíamos e eu era apenas um co-orientada da co-orientadora dela. Com certeza as “Paulas do Carvão” deram o que falar. Tenho que agradecer também a toda a família dela, ao Bento, filho da Ana, que liberou o quarto da bagunça para a tia Paula, ao Marcus, o marido da Ana, pelo apoio e paciência com toda bagunça que as minhas estadas por lá geravam, aos pais da Ana e do Marcus, por toda a receptividade todas as vezes que estive por lá;

Ao PPGBM, pela oportunidade de realização do doutorado e desenvolver este projeto. Aos professores, por contribuírem para a minha formação e crescimento científico;

Ao Elmo, por toda a paciência, apoio e disposição, em todos os momentos, sempre pronto a ajudar.

Aos colegas de representação discente, Camila, Caio, Felipe e Marcos. Foi muito bom fazer parte deste grupo e realizar o UNITIG/2010, durante o doutorado não se aprende apenas a pesquisar, mas também toda a burocracia;

Aos professores Mariangela da Costa Algayer, Johnny Ferraz Dias e Mirian Salvador pela colaboração neste projeto de pesquisa;

A todo o Imunopovo, do Laboratório de Imunogenética, da UFRGS, que esteve comigo o dia-a-dia destes 4 anos. À Fernanda Rabaioli, por toda parceria, por me ensinar e aprender junto comigo novas técnicas, por me escutar e me entender, me fazer rir, sempre (e como, ne?). Formamos uma bela dupla neste período. À Camile, por toda a ajuda nos períodos de coleta, ficando de base em Porto Alegre, além de toda a ajuda com as genotipagens. Aos trigêmios da

espermoteca, à Lari, por garantir a diversão no lab, ao Pedro (e o Ricardo, o melhor guia de Londres) e Bel, pela amizade, pela divisão do espaço, para técnicas tão distintas, pelas conversas sérias ou jogadas fora. Ao pessoal da Bioinformática, Gustavo, Marialva, Maurício R, Samuel, em especial ao Dinler, por manter os níveis de nitrogênio, e, assim as minhas amostras congeladas. A todo o pessoal da molecular, Mila, Cíntia, Francis, Jacque, Ju, Pietra, Simone, Tiago Veit, e também a todo o pessoal da molecular Bruno Bellagamba, Cadu, Tiago Dalberto, pela convivência, apoio e risadas. Ao Zéca, pelas conversas e discussões, científicas ou sobre besteiras mesmo, e por aceitar, mesmo que sob pressão, se o relator da minha tese. A Mariom, pelo incentivo desde a graduação.

A todos do Lab de Genética Toxicológica da ULBRA. Aos mais antigos Aline, Carem, Dani, Débora, Letícia, Mariza, Martus, Meri, Mila, Ricardo, Roberta, Sebastião e Vivian, parceiros de viagens, fosse para coleta ou para congresso/curso. Ao grupo atual, um “bando de 18”, Aline, Ana, Angélica, Camila, Duda, Gabi, Ju Reyes (a chefe da patota), Mari, Natália e Rúbia, por toda a parceria e paciência na reta final, mas também por todas as risadas, que deixaram esta fase um pouco mais leve. É claro, que fica um agradecimento especial para todas que participaram de alguma etapa deste trabalho, fosse lá no início ou agora aos 45 do segundo tempo, se não fossem vocês tudo seria mais difícil;

Tenho que agradecer as “chefas”, também... À Kátia, minha orientadora, por todos esses anos de convivência, desde a graduação, por todas as cobranças para eu fazer as coisas acontecerem, e, principalmente, confiança na execução e nas escolhas do meu projeto. À Ju, minha co-orientadora, de quem “herdei” o projeto com carvão, que foi uma grande incentivadora, que estava sempre disposta a achar uma saída (principalmente, quando eu já estava prestes a jogar a toalha) mesmo que para isso, fosse necessária alguma reunião, entrevista e até a participar de coleta (com certeza, a maior furada). Muito obrigada;

Aos professores Rafael Dihl e Alexandre Ferraz, pela ajuda na tentativa frustrada de colocar o Plano B em prática.

Ao Cláudio, por estar ao meu lado em alguns momentos deste trabalho, por me incentivar, quando nada parecia dar certo, sempre me fazendo acreditar em alguma possibilidade;

Aos amigos das jantas “temáticas”, Bruno Paiva, Gabi, Gui, Isma, Diny, Nayê e Paulinha, pela amizade que atravessou as paredes do laboratório. Essa turma é diversão garantida, independente do cardápio, do cachorro-quente, a janta francesa, e isso tudo faz um bem enorme. Mau B, (não me esqueci de você, não!), mas tenho que te agradecer por participar da última, mas mais emocionante das coletas. Certo que tu tornou todo o acontecimento mais leve.

Às minhas amigas, Cris Trinca, Déia Vargas, Déia Wieck, Mel Camassola, Mel Markoski e Pri Vianna, sempre companheiras para uma cerveja, uma sinuca, colocar um papo fora, porque momentos de relax são necessários para manter o foco e a capacidade de produzir, quando nada mais parece ajudar;

À toda a minha família, que mesmo sem compreender ao certo o que eu estava fazendo, estavam lá para incentivarem, sempre...

À Dinda Núbia, a futura bióloga Maíra, e a futura afilhada Camila. Foi muito bom ter a oportunidade de voltar a conviver com vocês. Muito obrigada por terem aberto as portas da casa de vocês, não só para mim, mas também para a minha colega. Muito obrigada por tudo!!

Aos tios Anna e Paulinho, Clóvis e Sigrid, agradeço pelo incentivo e também pela carona para a fronteira;

Aos Dindos Jaime e Vera, por todo o apoio, na reta final, a qual acabaram sendo obrigados a acompanhar;

À minha irmã preferida, Bruna, com quem posso contar sempre. Muito obrigada, maninha;

À Dinda Bere (Que Dinda, quase uma mãe!). Com toda a certeza sem ela tudo isso seria muito, mas muito mais difícil! Dinda muito obrigada por tantas caronas para todos os lados (ir e/ou voltar das coletas: POA – Bagé, Montenegro

– Bagé, Amoreiras – Candiota, Bagé – Candiota,...), até mesmo quando era preciso mudar os teus planos, por todo o teu apoio e incentivo, sempre, por ajudar e até mesmo fazer as coletas de solo, quando tentamos colocar o Plano B em prática. E claro por, sempre que possível, proporcionar grandes momentos pré-coleta nas Amoreiras;

Aos meus pais, Jacob e Sirlei, por tudo sempre! Por sempre estarem dispostos a me ajudar, por todo o interesse em saber o que estava acontecendo (mesmo quando a resposta era: “Não quero falar de trabalho”), por suportarem meu mau humor, quando nada tava dando certo (e olha que esses momentos foram bem frequentes), por festejarem cada pequena vitória, além de sempre encontrarem uma forma de facilitar a minha vida (transportando os materiais de coleta, emprestando o carro para eu conseguir ir atrás das amostras, como também me acompanhando no campus nos finais de semana, para processar as amostras, mesmo que fosse dia dos Pais e o campus estivesse as escuras). Não tenho ideia de como faria sem todo o apoio de vcs! Muito obrigada por tudo! Eu amo vocês!

SUMÁRIO

ABREVIATURAS	10
LISTA DE FIGURAS	12
CAPÍTULO II	12
LISTA DE TABELAS	13
CAPÍTULO II	13
CAPÍTULO III	13
CAPÍTULO IV	14
RESUMO	15
ABSTRACT	17
CAPÍTULO I	19
1. INTRODUÇÃO	20
1.1 O Carvão	21
1.2 Carvão no Brasil	23
1.3 Composição do Carvão	25
1.4 Agentes mutagênicos correlacionados ao carvão	26
1.4.1 Metais pesados	26
1.4.2 Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP)	26
1.5 Genotoxicidade associada ao carvão	27
1.6 Monitoramento Biológico	28
1.6.1 Biomarcadores de Exposição	29
1.6.2 Biomarcadores de Efeito	31
1.6.3 Biomarcadores de Suscetibilidade	34
2. OBJETIVOS	37
1.7 Objetivo Específicos	37
CAPÍTULO II	38
CAPÍTULO III	58

CAPÍTULO IV	80
CAPÍTULO V	99
1. DISCUSSÃO.....	100
2. CONCLUSÃO.....	112
REFERÊNCIAS	113
ANEXOS.....	122

ABREVIATURAS

AC – Aberrações Cromossômicas

ANEEL – Agência Nacional de Energia Elétrica

b.s. – base seca

BER – *Base Excision Repair* ou Reparo por excisão de base

BMCyt – *Buccal Mucosa Cytome Assay* ou Teste de MN em Linfócitos Binucleados e em Mucosa Oral

CAT – Catalase

DF – *Damage Frequency* ou Frequência de Dano

DI – *Damage Index* ou Índice de Dano

DNPM – Departamento Nacional de Produção Mineral

EPA – *U.S. Environmental Protection Agency* ou Agência de Proteção Ambiental do Estados Unidos

FD – Frequência de Dano

GPx – glutathione peroxidase

HAP – hidrocarbonetos aromáticos policíclicos

ID – Índice de Dano

MMR – *Mismatch Repair* ou Reparo de Emparelhamento Incorreto de Bases

MN – Micronúcleos

NER – *Nucleotide Excision Repair* ou reparo por excisão de nucleotídeo

NORA – National Occupational Research Agenda

PAH – *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons* ou Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos

PPE – *Protective Measures Adopted* ou Medidas de Proteção Utilizadas

RL – Radicais Livres

RNS – *Reactive Nitrogen Species* ou Espécies Reativas de Nitrogênio

ROS – *Reactive Oxygen Species* ou Espécies Reativas de Oxigênio

SOD – Superóxido Dismutase

SSB – *Single-Strand Breaks* ou Quebras de Fita Simples

TBARS – *Thiobarbituric acid reactive substances* ou substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TCI – Troca de Cromátides Irmãs

tep – toneladas equivalentes de petróleo

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULOS I & V

Figura 1. Vista noturna da terra, mostrando as luzes das cidades em branco. Fonte: http://www.yayhooray.com/thread/142252/The-World-at-Night....	20
Figura 2. Estágios de carbonificação, e seus usos (Fonte: Brasil, 2009).	22
Figura 3. Oferta interna de energia no Brasil, no ano de 2010 (Modificado de Energética, 2011).	23
Figura 4. Reservas e produção de carvão mineral do Brasil (ANEEL, 2002).	24
Figura 5. Teste Cometa, células classificadas de 0, sem dano a 4, com a maior parte do DNA na “cauda do cometa” (Modificado de (Villela <i>et al.</i> , 2006)..	30
Figura 6. Teste de Micronúcleo: Linfócitos Binucleados com MN (A), Ponte Citoplasmática (B) e Brotos Celulares(C).	32
Figura 7. Modelo para a classificação celular de mucosa oral conforme a morfologia nuclear (Fonte: Thomas <i>et al.</i> , 2009).	33
Figura 8. Vias possíveis de biotransformação dos xenobióticos. (Modificado de: Iarmacovai, 2008).	34
Figura 9. Processos celulares que influenciam a produção de espécies reativas de oxigênio – ROS.	107

CAPÍTULO II

Figure 1. Frequencies of the damage classes observed using the comet assay.	56
---	----

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULOS I

Tabela 1. Características do carvão da mina de Candiota.	25
---	----

CAPÍTULO II

Table 1. Cytogenetic parameters (mean \pm S.D.) of unexposed individuals and workers exposed to coal.....	55
---	----

Table 2. Oxidative stress marker analysis of non-exposed and coal-exposed individuals.....	57
--	----

CAPÍTULO III

Table 1. Buccal micronucleus cytome assay results for cells collected from non-exposed and exposed groups (mean \pm standard deviation).....	75
--	----

Table 2. Cross-correlation results between biomarkers of the buccal micronucleus cytome assay for combined groups.....	76
--	----

Table 3. Effect of the GSTM1 and GSTT1 genotypes on the exposed group.....	77
--	----

Table 4. Inorganic element detection by PIXE analyses of blood samples.	78
--	----

Table 5. Inorganic element detection by PIXE analyses of soil samples.	79
--	----

CAPÍTULO IV

Table 1. Effect of the OGG1 and XRCC1 genotypes on parameters evaluated using the comet assay in the non-exposed and exposed groups (mean \pm S.D.). P value from Mann Whitney U-test..... 95

Table 2. Effect of the OGG1 and XRCC1 genotypes on parameters evaluated using the BMCyt assay in the non-exposed and exposed groups (mean \pm S.D.). In bold significant results (Mann Whitney U-test)..... 96

RESUMO

A energia é um ingrediente essencial para o desenvolvimento econômico. Para a produção de energia são utilizadas diversas fontes, como o carvão mineral, que foi uma das primeiras fontes de energia utilizadas pelo ser humano em larga escala. O carvão consiste de uma mistura complexa de substâncias químicas orgânicas, constituída por carbono, hidrogênio e oxigênio, principalmente, e por quantidades menores de nitrogênio e enxofre. O Brasil apresenta a 10^a maior reserva de carvão do mundo, com um total de 12 bilhões de toneladas. No Rio Grande do Sul ficam quase 90% das reservas nacionais, a Jazida de Candiota (RS) possui 38% de todo o carvão nacional. A exposição ao carvão e seus efeitos genotóxicos e mutagênicos vêm sendo estudados com diferentes enfoques e também em diferentes organismos. Considerando a composição do carvão, conhecida por apresentar componentes genotóxicos, e a falta de estudos em trabalhadores expostos deste setor produtivo, este trabalho tem como objetivo realizar biomonitoramento de uma amostra de trabalhadores deste setor, da região de Candiota- Rio Grande do Sul. Para isso, foram coletados sangue e mucosa oral de 57 indivíduos ocupacionalmente expostos ao carvão e de 71 indivíduos não expostos ao carvão. O Ensaio Cometa, o teste de MN em linfócitos binucleados e em mucosa oral, marcadores de estresse oxidativo bem como o conteúdo de elementos traço foram avaliados nas amostras. Os polimorfismos *GSTT1* nulo, *GSTM1* nulo, *OGG1 Ser326Cys* e *XRCC1 Arg194Trp* foram analisados para verificar a possível modulação destes genes de suscetibilidade nos resultados dos biomarcadores. Indivíduos expostos apresentaram maiores danos no DNA. Nossos resultados mostraram aumento significativo em Índice de Dano ($P = 0,002$) e FD ($P < 0,001$), parâmetros analisados no Ensaio Cometa, em frequência de MN ($P < 0,001$) e Pontes citoplasmática ($P < 0,001$), parâmetros do teste de MN em linfócitos binucleados, frequência de MN em células basais ($P < 0,001$) e em células diferenciadas ($P < 0,001$), frequência de células binucleadas ($P < 0,05$), no BMCyt em comparação com os indivíduos não-expostos. Observamos redução significativa da frequência de células com cromatina condensada ($P < 0,001$), no BMCyt, que é um

parâmetro de morte celular. O grupo exposto apresentou aumento no estresse oxidativo, pelo aumento de SOD ($P < 0,001$), por outro lado, houve uma redução de CAT e TBARS (ambos com $P < 0.001$). As amostras dos trabalhadores apresentar quantidades de magnésio (Mg), alumínio (Al), cobre (Cu), e zinco (Zn), apesar de não terem diferenças significativas, já a análise do ambiente, o solo de Candiota mostrou maiores quantidades de fósforo (P), enxofre (S) e chumbo, quando comparado com o solo de Bagé, onde não há a atividade de mineração. A análise dos polimorfismos *GSTT1* nulo, *GSTM1* nulo, *OGG1 Ser326Cys* e *XRCC1 Arg194Trp* mostrou influência do polimorfismo *GSTM1* nulo na frequência de brotos nucleares, dos indivíduos expostos, e do polimorfismo *XRCC1 Arg194Trp* na frequência de células cariorréticas e piquinóticas, dos indivíduos não-expostos. Indivíduos expostos com o genótipo *GSTM1* nulo apresentaram aumento significativo na frequência de brotos em relação aos indivíduos com o genótipo *GSTM1* não- nulo ($P=0.023$). Entre os indivíduos não expostos, o genótipo *XRCC1 Arg/Trp* apresentou menores frequências de células cariorréticas e piquinóticas quando comparados com indivíduos do mesmo grupo com o genótipo *XRCC1 Arg/Arg* ($P=0,048$ e $P=0.004$, respectivamente). Assim, o dano ao DNA observado nos indivíduos expostos pode ser consequência do dano oxidativo resultante da exposição aos resíduos do carvão, inclusive os metais.

ABSTRACT

Energy is an essential ingredient for economic development. For the production of energy are used various sources, as coal which was the first source of energy used by humans in large scale. The coal is a complex mixture of organic chemicals, comprising carbon, hydrogen and oxygen, especially, and minor amounts of nitrogen and sulfur. Brazil has the 10th largest coal reserves in the world with a total of 12 billion tons. In Rio Grande do Sul are almost 90% of national reserves, the Jazida Candiota (RS) has 38% of all coal national. Exposure to coal and its genotoxic and mutagenic effects has been studied with different approaches and also in different organisms. Considering the composition of coal known to have genotoxic components, and the lack of studies in exposed workers of this sector, the aim of this study was to conduct biomonitoring of a sample of workers in this sector, the region Candiota – Rio Grande do Sul. For this, we collected blood and oral mucosa of 57 individuals occupationally exposed to coal and 71 individuals not exposed to coal. The Comet assay, the test of MN in binucleated lymphocytes and oral mucosa, oxidative stress markers and the content of trace elements were measured in the samples. The polymorphisms *GSTT1* null, *GSTM1* null, *OGG1* Ser326Cys and *XRCC1* Arg194Trp were analyzed to verify the possible modulation of these genes results in susceptibility biomarkers. Exposed individuals showed higher DNA damage. Our results showed a significant increase in DI ($P = 0.002$) and DF ($P < 0.001$) parameters analyzed in the Comet assay in frequencies of MN ($P < 0.001$) and cytoplasmic bridges ($P < 0.001$), parameters in MN test in binucleated lymphocytes, MN frequency in basal cells ($P < 0.001$) and in differentiated cells ($P < 0.001$), frequency of binucleated cells ($P < 0.05$) in BMCyt compared with unexposed individuals. Observed a significant decrease in the frequency of cells with condensed chromatin ($P < 0.001$) in BMCyt, which is a parameter of cell death. The exposed group showed an increase in oxidative stress by the increase in SOD ($P < 0.001$) on the other hand, a reduction of CAT and TBARS (both $P < 0.001$). Samples from workers

present amounts of magnesium (Mg), aluminum (Al), copper (Cu), zinc (Zn), although no significant differences, the environmental analysis, soil Candiota showed higher amounts of phosphorus (P), sulfur (S) and lead compared to the soil Bagé, where there no mining. Exposed individuals with the GSTM1 null genotype showed a significant increase in the frequency of buds nuclear related to individuals with the GSTM1 non-null genotype ($P = 0.023$). Among the non-exposed individuals, the genotype XRCC1 Arg / Trp showed lower frequencies of Karyorrhetic and Pyknotic Cells when compared with individuals of the same group with the genotype XRCC1 Arg / Arg ($P = 0.048$ and $P = 0.004$, respectively). DNA damage observed in the exposed mining workers may be a consequence of oxidative damage resulting from coal residue mixtures, including metals. Besides, our results confirm the BMCyt assay as good biomarker to occupational exposure.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A energia é um ingrediente essencial para o desenvolvimento econômico. A Figura 1 traz uma vista noturna da Terra, a partir de satélites, mostrando as regiões mais claras onde há maior consumo de energia, correspondendo também às regiões com maior desenvolvimento econômico.

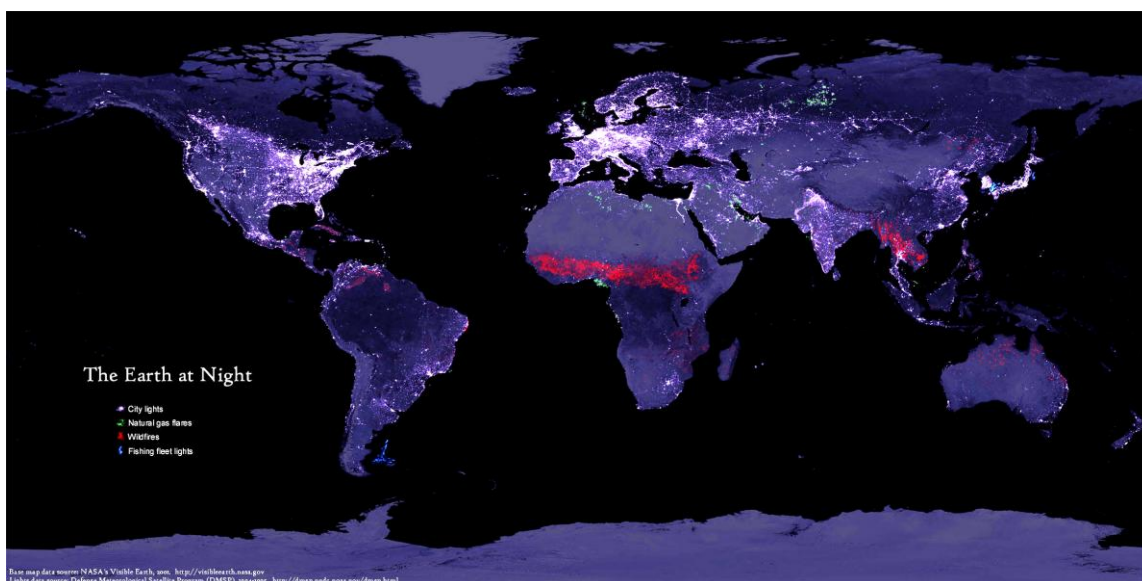


Figura 1. Vista noturna da terra, mostrando as luzes das cidades em branco.

Fonte: <http://www.yayhooray.com/thread/142252/The-World-at-Night>

No Brasil, foi apontado um aumento de aproximadamente 10% no consumo de energia, no ano de 2010, em relação ao ano anterior, passando de 226.094 X 10³ tep (toneladas equivalentes de petróleo) (Energética, 2011). Para atender esse aumento no consumo, é necessário, também, um aumento na produção de energia.

Para a produção de energia são utilizadas diversas fontes. Fontes estas que podem ser classificadas em renováveis e não-renováveis, sendo que, em 2010, no Brasil, estas foram responsáveis por 45,4% e 54,6%, respectivamente,

da oferta interna de energia (Energética, 2011). Dentre as renováveis podemos citar as seguintes fontes: biomassa, eólica, geotérmica, hidráulica, e solar. Enquanto que, entre as não-renováveis estão os combustíveis fósseis como: petróleo, gás natural e o carvão mineral. Os combustíveis fósseis são a origem de 85% da energia mundialmente consumida (Energética, 2011).

1.1 O Carvão

O carvão mineral, ou simplesmente carvão, consiste de uma mistura complexa de substâncias químicas orgânicas, constituída por carbono, hidrogênio e oxigênio, principalmente, e por quantidades menores de nitrogênio e enxofre (Gibson, 1979). O carvão é formado a partir da matéria orgânica vegetal depositada em bacias sedimentares. Pela ação de pressão e temperatura em ambiente anaeróbico, em decorrência de soterramento e atividade orogênica, os restos vegetais ao longo do tempo geológico se solidificam e, através do processo de carbonificação, perdem oxigênio e hidrogênio, enriquecendo-se de carbono (DNPM, 2009).

Sua qualidade, determinada pelo conteúdo de carbono, aumenta com o passar dos estágios de carbonificação. A turfa, de baixo conteúdo carbonífero, constitui um dos primeiros estágios do carvão, seguido do linhito, do carvão betuminoso (hulha), o mais utilizado como combustível, e o antracito, o mais puro dos carvões que apresenta um conteúdo carbonífero superior a 90%, conforme Figura 2.

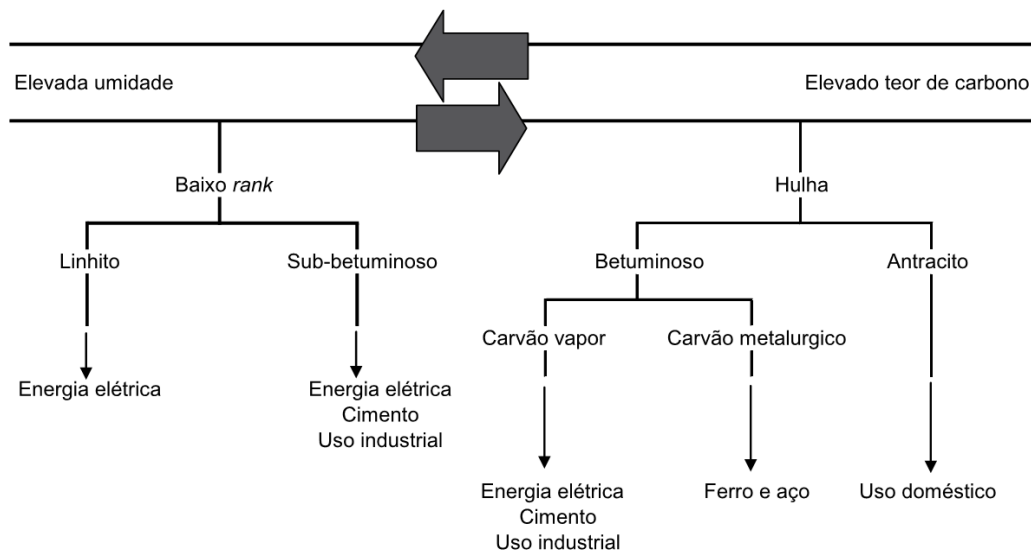


Figura 2. Estágios de carbonificação, e seus usos (Fonte: Brasil, 2009).

O carvão foi uma das primeiras fontes de energia utilizadas pelo ser humano em larga escala (ANEEL, 2008). No mundo, em 2009, o carvão mineral e seus derivados representavam 19,7% da oferta de energia. Sabendo-se que o carvão tem e continuará a desempenhar um papel importante na oferta mundial de energia por muitas décadas, a cooperação entre governos, empresas é necessária em vários setores para acelerar a melhoria do desempenho ambiental com a utilização de carvão. São necessárias políticas para incentivar a implantação de tecnologias mais eficientes de carvão limpo, particularmente aquelas que podem oferecer reduções significativas nas emissões de gases de efeito estufa através da captura e armazenamento de CO₂. Como também é preciso um aprofundamento do conhecimento do carvão em termos de sua estrutura, de seu comportamento e do seu potencial danoso, principalmente no que se refere aos riscos decorrentes do seu intenso uso, para que se possam minimizar seu efeito nocivo ao ser humano e o seu impacto à natureza.

1.2 Carvão no Brasil

No Brasil o carvão mineral é utilizado principalmente para a geração de energia elétrica, mas também para a produção de cimento, aço ferro-gusa, papel/celulose, cerâmica. Em 2010, o carvão representava 5,1% da oferta interna de energia (Figura 3), crescendo 18,5% em relação a 2009 (Energética, 2011).

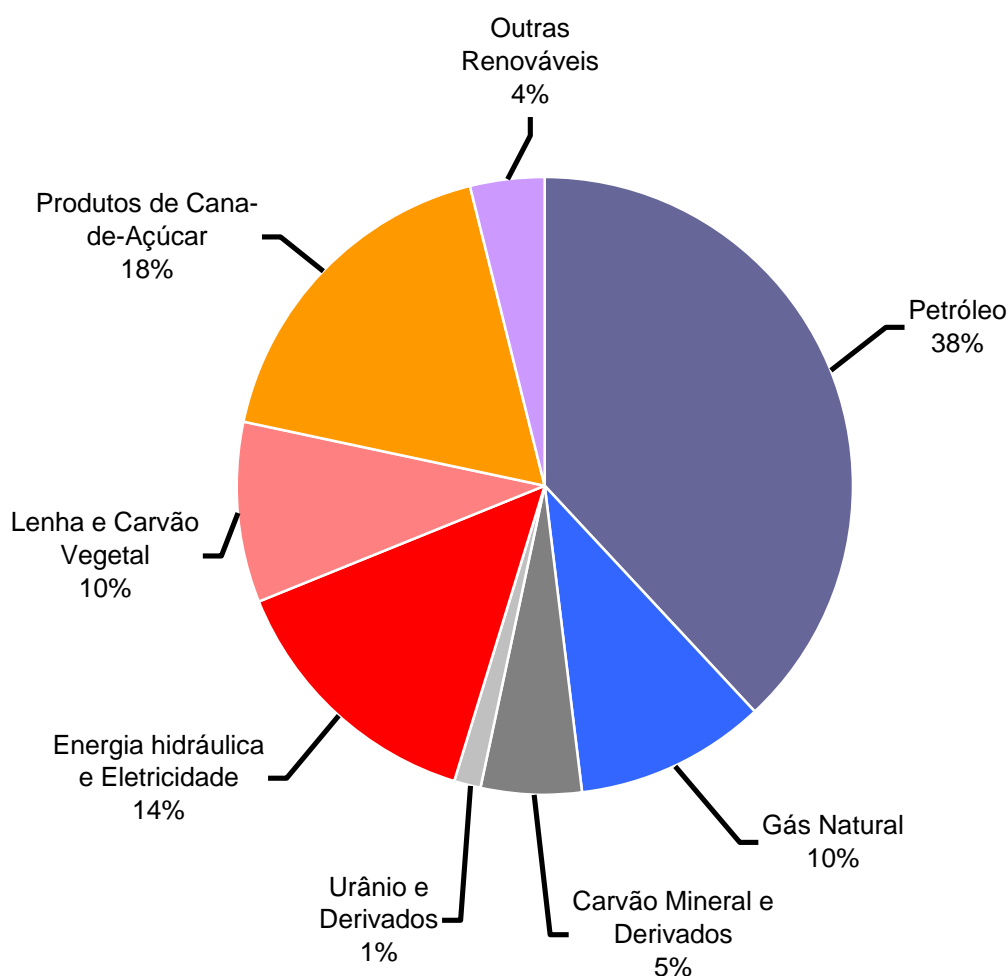


Figura 3. Oferta interna de energia no Brasil, no ano de 2010 (Modificado de Energética, 2011).

Nosso país dispõe de uma das maiores reservas de carvão da América Latina, representando a 10ª maior do mundo, com um total de 12 bilhões de toneladas. Há ocorrências de linhito e carvão sub-betuminoso em vários estados brasileiros: Minas Gerais, Bahia, Pernambuco, Piauí, Maranhão, Pará, Amazonas e Acre. A Figura 4 traz as reservas brasileiras com importância econômica, que estão restritas ao sul do país, na bacia do Paraná, nos Estados do Rio Grande do Sul (RS) (89,25%), Santa Catarina (10,41%), Paraná (0,32%) e São Paulo (0,02%). Somente a Jazida de Candiota (RS) possui 38% de todo o carvão nacional (ANEEL, 2008; DNPM, 2001).



Figura 4. Reservas e produção de carvão mineral do Brasil (ANEEL, 2002).

No Rio Grande do Sul, Candiota, na região da Campanha é onde estão localizadas as maiores jazidas, e a mineração destas ocorre em minas a céu aberto. O carvão extraído em Candiota apresenta as características apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Características do carvão da mina de Candiota.

Característica do Carvão	Teores Médios do Carvão ROM (%)
Umidade total	16,00
Cinzas (b.s.*)	52,70
Material volátil (b.s.*)	21,20
Carbono Fixo (b.s.*)	26,10
Enxofre total (b.s.*)	1,30
Poder Calorífico Superior (b.s.*)	3262,00

*b.s. = Valores em base seca.

Fonte: http://www.crm.rs.gov.br/hypervisual/carvao/carvao_candiota.php?secao=carvao

1.3 Composição do Carvão

Devido a formação do carvão, a sua mineração libera grande quantidade de substâncias no meio, fazendo esta atividade uma das maiores fontes de contaminação ambiental. Tais substâncias uma vez liberadas ao meio formam misturas complexas consistente de COx, NOx, SOx, cristais de silício alumínio, quartzo, metais pesados (arsênico, boro, cádmio, cromo, chumbo, cobre, selênio, ferro, zinco) e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP) (Zhou *et al.*, 2005). As concentrações destas substâncias podem variar conforme a origem do carvão.

1.4 Agentes mutagênicos correlacionados ao carvão

1.4.1 Metais pesados

Entre os elementos químicos presentes no carvão, associados a genotoxicidade, os metais pesados estão em altas concentrações. Os metais que destacam-se são: o cobre, o chumbo, o cádmio, o níquel, o vanádio e o zinco (Hopkins *et al.*, 1999; Moriske *et al.*, 1996). Embora os metais pesados, tanto sozinhos como atuando em sinergia com algum outro agente, sejam considerados parte de um grupo potencialmente mutagênico presente no ambiente, evidências relacionadas à carcinogenicidade em humanos são controversas (Minissi & Lombi, 1997). Estudos demonstram a provável via em que a carcinogênese é desencadeada, através de um aumento nas lesões do DNA ou pelo aumento da geração de espécies reativas do oxigênio e/ou por interferência nos processos de reparo do DNA (Jose Zocche *et al.*, 2010; Leffa *et al.*, 2010).

1.4.2 Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP)

Os HAP são introduzidos no ambiente através de fontes naturais ou antropogênicas, sendo formados quando o material orgânico é submetido a combustão incompleta. Entre as fontes biogênicas, se destacam a combustão natural de florestas e a exsudação natural de petróleo. Mas são as fontes antropogênicas, resultantes das atividades humanas, as maiores contribuintes destes compostos para o ambiente (Vale, 1997).

Essas substâncias podem ser consideradas potencialmente danosas ao ambiente e a saúde humana (Sram *et al.*, 1985). Os HAP são tóxicos, mutagênicos e/ou cancerígenos, sendo a quebra simples o principal tipo de lesão ocasionado no DNA e ocorre via mecanismos de reparo (Brescia *et al.*, 1999; Hasspieler *et al.*, 1995; Pavanello *et al.*, 2005c; Rojas *et al.*, 2000). Além da interação covalente de seus metabolitos eletrofílicos com o DNA (Pereira-Neto *et*

al., 2000; Singh *et al.*, 2007), formando aductos com as purinas, principalmente guanina após a metabolização pelo complexo CYP 450 (Baird *et al.*, 2005). Assim, devido as suas características, se determinou a inclusão de dezesseis hidrocarbonetos na lista dos poluentes orgânicos prioritários pela U.S. *Environmental Protection Agency* (EPA).

Alguns destes tipos de HAP são encontrados nos extratos dos carvões das minas de Minas de Leão (RS) e de Candiota (RS), como: fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, trifenileno, benzo(e)pireno, indeno(1,2,3-cd)pireno, benzo(a)pireno e benzo(g,h,l)perileno (Dallarosa *et al.*, 2005; Peralba, 1990). O potencial risco ambiental que os HAP e seus derivados representam, é atualmente objeto de conscientização dentro de toda comunidade científica. Grandes esforços vêm sendo feitos na busca de procedimentos experimentais para o estudo da reatividade, do mecanismo de transformação, da quantificação e das prioridades no estudo dos HAP (Vale, 1997).

1.5 Genotoxicidade associada ao carvão

A exposição ao carvão e seus efeitos vêm sendo estudados com diferentes enfoques e também em diferentes organismos, como anelídeos, mamíferos, até mesmo em algumas linhagens celulares e também em humanos (Celik *et al.*, 2007; da Silva *et al.*, 2000a; Jose Zocche *et al.*, 2010; Leon-Mejia *et al.*, 2011; Leon *et al.*, 2007; Verschaeve & Gilles, 1995).

Silva *et al.* (2000) observaram aumento do número de micronúcleos (MN) e dos níveis de danos detectados no Ensaio Cometa de *Ctenomys torquatus* (tucotuco) de regiões mineradoras do Estado do RS, quando comparados com regiões sem carvão. Outros estudos no Brasil também demonstram o efeito danoso do carvão em outros organismos, como em morcegos e em moluscos (Jose Zocche *et al.*, 2010; Leffa *et al.*, 2010). Em áreas de mineração da Colombia foram encontrados resultados semelhantes em ratos e camundongos (Leon *et al.*, 2007). Assim como estes trabalhos, muitos outros demonstraram o efeito danoso do

carvão e seus derivados em diversas linhagens de células (Granello & Clonfero, 1992; Gu *et al.*, 1992; Leonard *et al.*, 1984; Stierum *et al.*, 1993).

Estudos realizados com trabalhadores de minas de carvão a céu aberto, bem como com aqueles de escavações, foram demonstrados aumento no índice de aberrações cromossômicas (AC) e troca de cromátides irmãs (TCI) (Donbak *et al.*, 2005; Leon-Mejia *et al.*, 2011; Sram *et al.*, 1985). Também foi observada indução de AC, TCI e MN em trabalhadores de usinas termoelétricas, que utilizam o carvão como fonte de energia (Siwinska *et al.*, 2004; Sram *et al.*, 1985).

Além dos efeitos genotóxicos do carvão, há também estudos que evidenciam maior incidência de sintomas crônicos e agudos do trato respiratório em populações exposta nas minas (Mamuya *et al.*, 2007). Hendryx *et al.* (2008) demonstraram maior incidência e mortalidade devido a câncer de pulmão em população que vivia próxima à mineradora, na região de Appalachia nos EUA.

Apesar do RS ser responsável por cerca de 90% das jazidas de carvão do Brasil, e, assim, um dos principais produtores de carvão do país, até o momento não existem estudos avaliando o risco ocupacional dos trabalhadores deste importante setor produtivo do Estado.

1.6 Monitoramento Biológico

Entre as diversas definições para monitoramento biológico, as mais completas são as que preveem uma aplicação epidemiológica, utilizada para mensurar diretamente a espécie e a distribuição de elementos tóxicos na população, como também para confrontar os indicadores biológicos com as modificações no estado de saúde dos indivíduos expostos (Amarin, 2003; Pivetta *et al.*, 2001; Siemiatycki *et al.*, 2004).

Para estudos de monitoramento populacional são usados biomarcadores. O termo biomarcador é usado para expressar uma medida específica de uma interação entre determinado sistema biológico com um agente genotóxico. Sendo

assim, os biomarcadores podem ser classificados em três categorias: (i) biomarcadores de exposição; (ii) biomarcadores de efeito; (iii) biomarcadores de suscetibilidade (Cebulska-Wasilewska, 2003).

1.6.1 Biomarcadores de Exposição

Os biomarcadores de exposição consistem em medidas quantitativas de substâncias químicas ou de seus metabólitos em fluidos biológicos ou, a medida de uma alteração bioquímica precoce e reversível em fluidos biológicos que reflita a exposição. Alguns biomarcadores de dose interna, como benzeno no sangue, ácido hipúrico e 2,5-hexanodiona na urina, refletem apenas a exposição recente ao benzeno, tolueno e n-hexano, respectivamente, enquanto outros refletem a exposição média dos últimos meses, como o chumbo e mercúrio no sangue, ou até mesmo em anos, como cádmio na urina (Amorin, 2003; Bonassi & Au, 2002; Lowry, 1995).

O Ensaio Cometa (Figura 2) tem sido utilizado como um marcador de exposição importante, quando avaliado logo após o período de contato com o xenobiótico, refletindo a ação do agente em quebras simples e dupla do DNA, dano oxidativo, *crosslinks* DNA-DNA, DNA-proteína, DNA-drogas e indução de apoptose. 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 (Dusinska & Collins, 2008; Maluf & Erdtmann, 2003; Villela *et al.*, 2003).

O Teste Cometa apresenta como vantagem a simplicidade, rapidez e sensibilidade em detectar pequenas alterações e baixo custo. Entretanto esta análise não é considerada como um teste de mutagenicidade uma vez que o efeito do reparo pode mudar o resultado final considerando a fixação de mutação (Dusinska & Collins, 2008; Maluf & Erdtmann, 2003; Villela *et al.*, 2003).

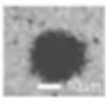
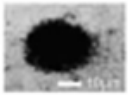
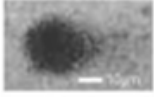
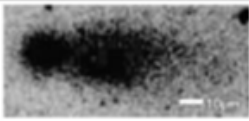

Dano Observado	Cabeça/Cauda	Classes de Danos
	Sem Cauda	0
	≤1	1
	1 – 2	2
	≥2	3
	Sem Cabeça	4

Figura 5. Teste Cometa, células classificadas de 0, sem dano a 4, com a maior parte do DNA na “cauda do cometa” (Modificado de (Villela *et al.*, 2006).

Os ensaios de estresse oxidativo também podem ser utilizados como biomarcadores de efeito. O estresse oxidativo ocorre quando há um desbalanço entre pró-oxidantes e antioxidantes em favor dos primeiros, podendo afetar os mais diferentes órgãos (Beckman & Ames, 1998).

Radicais livres (RL), uma importante categoria de moléculas oxidantes e que participam de muitos processos fisiológicos, são espécies químicas que possuem um elétron não pareado na última camada eletrônica e que são responsáveis por sua grande reatividade e alta capacidade de provocar lesões oxidativas (Gutteridge & Halliwell, 2000). Estudos recentes vêm demonstrando que os RL participam no mecanismo de instalação de várias doenças (Gutteridge & Halliwell, 2000). No processo de carcinogênese química, os RL podem ativar o pró-carcinogênio e promover a sua ligação ao DNA. Podem ainda gerar lesões diretas no material genético ou formar radicais genotóxicos.

A fim de combater o excesso de RL o organismo possui defesas antioxidantes, que podem ser enzimáticas ou não-enzimáticas. Entre as enzimas podem ser citadas as formas citoplasmáticas e mitocondriais da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase.

As técnicas que vem sendo mais utilizadas na detecção dos RL baseiam-se, fundamentalmente na detecção de produtos ou alterações fisiológicas provocadas pelo estresse oxidativo. Entre estes testes, um dos mais conhecidos é a determinação dos produtos de reação do ácido de reação com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) resultante da peroxidação lipídica das membranas celulares (Beckman & Ames, 1998).

1.6.2 Biomarcadores de Efeito

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

O teste de aberrações cromossômicas é uma avaliação cromossômica internacionalmente aceita para biomonitoramento. Com ele são detectadas quaisquer mudanças na estrutura do cariótipo, por isso, é considerado um teste de mutagenicidade. O teste de AC tem utilização generalizada, podem ser realizado em diferentes organismos e tecidos, tanto *in vitro* como *in vivo*. Quando realizado *in vivo*, pode ser considerado também um teste de carcinogenicidade (Villela *et al.*, 2003).

A análise da frequência das trocas de cromátide irmãs, isto é, de translocações recíprocas entre o mesmo loco, é bastante sensível em estudos genotóxicos. Porém, além de ser muito trabalhoso, o teste de TCI não pode ser

considerado um teste de mutagênese, é apenas um indicativo, pois a TCI não resulta necessariamente em mutações (Villela *et al.*, 2003).

O teste do MN em linfócitos (Figura 6) é um dos mais utilizados como padrão de aberrações cromossômicas em eucariotos, sendo o mais eficaz para o monitoramento humano. A formação do micronúcleo é resultado da perda de cromossomos inteiros, ou apenas fragmentos de cromossomos. Assim, este teste detecta: mutagênese cromossômica, como clastogênese, aneugênese e danos no fuso mitótico (Maluf & Erdtmann, 2003; Villela *et al.*, 2003). Em uma análise conjunta, na mesma amostra, de Teste Cometa e Teste MN, pode-se inferir a atividade de mecanismos de reparo.

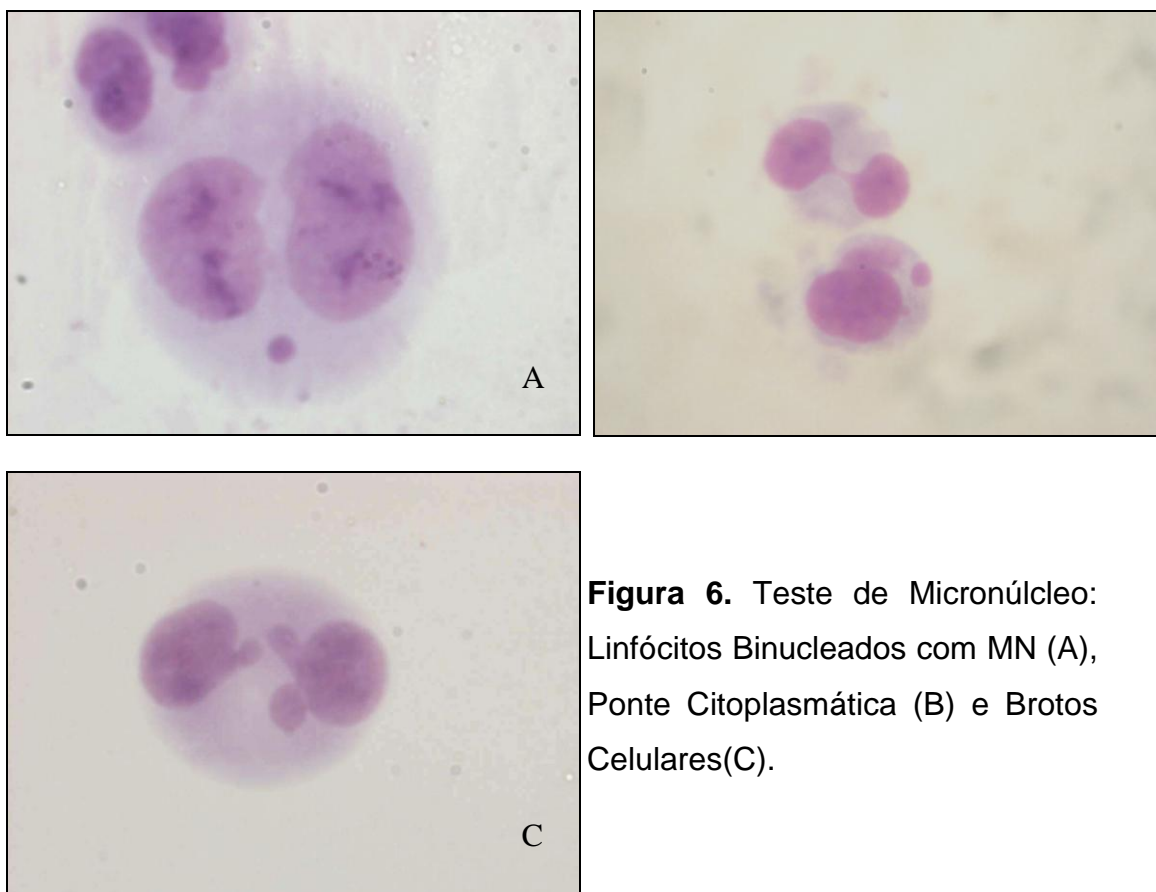


Figura 6. Teste de Micronúcleo: Linfócitos Binucleados com MN (A), Ponte Citoplasmática (B) e Brotos Celulares(C).

O teste do MN evoluiu rapidamente no campo da genética toxicológica por ser um método simples, que permite o uso de diferentes tipos de células,

como linfócitos e células do epitélio (Pastor *et al.*, 2003). A escolha das células da mucosa oral é considerada vantajosa, pois apresenta alto grau de divisões celulares e dispensa a realização de cultura celular *in vitro* (Heuser *et al.*, 2007).

Na camada basal, onde ocorrem divisões celulares, os danos sobre o DNA são identificados principalmente a partir da formação de MN, entretanto também se considera na análise a formação de brotos nucleares, células binucleadas (relacionadas a defeito citocinético) e anormalidades nucleares que representam morte celular, reconhecidas pela presença de cromatina condensada, células cariorréticas e picnóticas (Figura 7) (Thomas *et al.*, 2009).

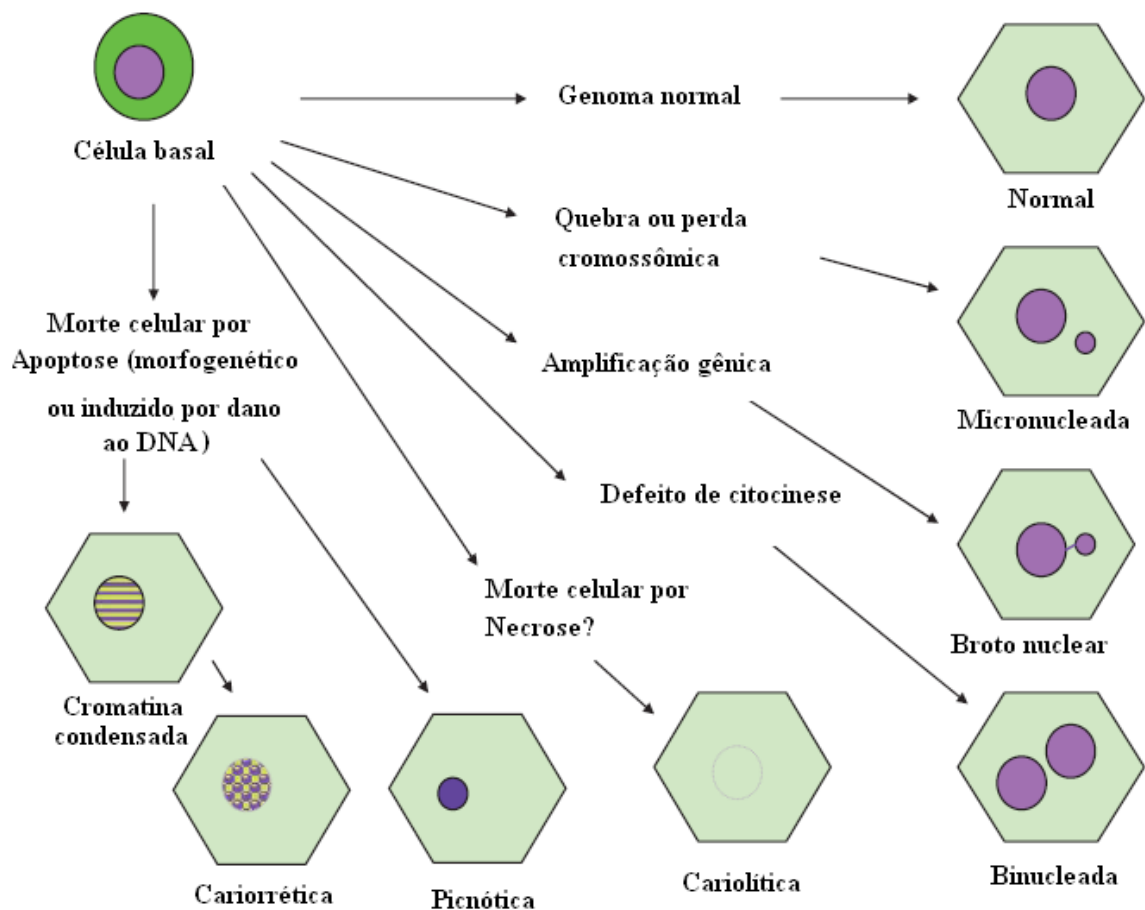


Figura 7. Modelo para a classificação celular de mucosa oral conforme a morfologia nuclear (Fonte: Thomas *et al.*, 2009).

1.6.3 Biomarcadores de Suscetibilidade

Estudos de associação entre vários polimorfismos marcadores intermediários envolvidos na cascata de eventos genotóxicos/carcinogênicos podem fornecer informações úteis quanto ao papel da suscetibilidade genética individual e a relação com a exposição ambiental/ocupacional a xenobióticos. A suscetibilidade individual aos efeitos dos xenobióticos é modulada por diferenças na capacidade de metabolização/detoxificação e também pela eficiência no sistema de reparo (Omenn, 1991). A Figura 8 traz as os processos de biotransformação possíveis. Os diferentes tipos de lesão são relacionados à diversidade de xenobióticos a qual os indivíduos são expostos.

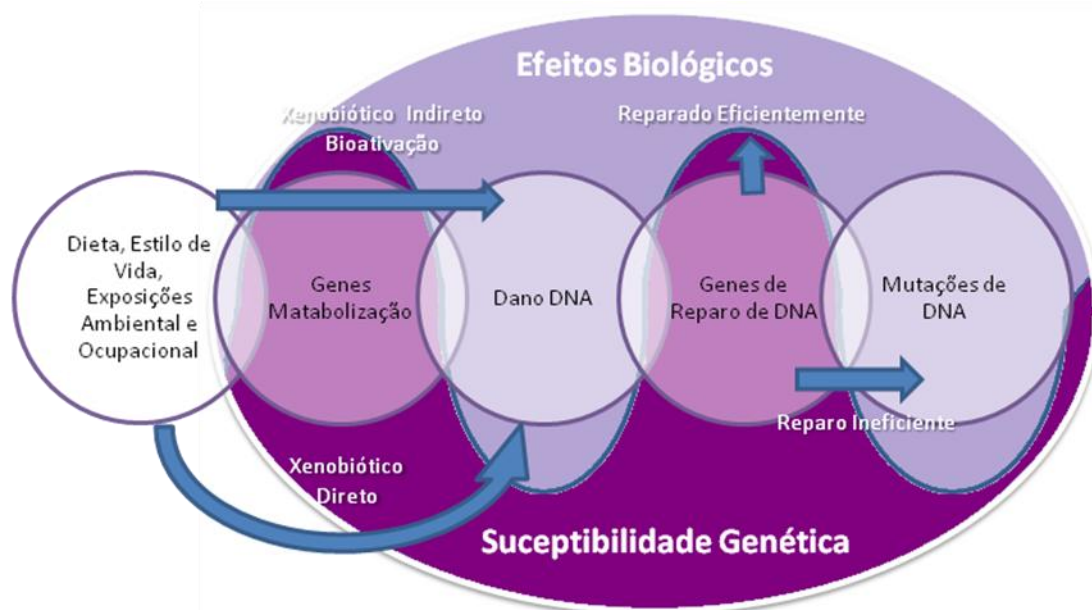


Figura 8. Vias possíveis de biotransformação dos xenobióticos. (Modificado de: Iarmacovai, 2008).

Estudos evidenciam a modulação de biomarcadores de suscetibilidade nos níveis de danos apresentados por indivíduos expostos ao carvão em mineradoras, como também em indústrias termoelétricas (Leng *et al.*, 2004; Pavanello *et al.*, 2005a).

A capacidade de biotransformação está extremamente relacionada com polimorfismos nos genes das enzimas de metabolização/detoxificação, e conseqüente alteração da atividade das enzimas que participam deste processo (Wilkinson & Clapper, 1997).

A maior parte dos processos de biotransformação ocorre em duas fases, dependendo do substrato em que ele estiver atuando. As enzimas de fase I, ou enzimas de ativação, representadas pela superfamília do citocromo P450, ativam o xenobiótico, tornando o mais eletrofílico e desta forma mais reativo, normalmente com a introdução de um grupamento funcional. Já as enzimas de fase II, ou de detoxificação, como a superfamília glutationa S-transferase, normalmente atuam com a 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 (Wilkinson & Clapper, 1997).

Diferenças na capacidade de biotransformação, devido aos polimorfismos nos genes das proteínas envolvidas, já foram demonstradas como responsáveis pelas diferenças individuais nos resultados do Ensaio Cometa e Teste de MN. Entre as enzimas de fase I, ou de Ativação, os polimorfismos mais estudados, quanto à influência na resposta a exposição a xenobióticos, estão os polimorfismos que ocorrem nos genes CYP1A1 e CYP2E1. Enquanto que nas enzimas de fase II, os polimorfismos mais estudados são os que ocorrem nos genes GSTM1, GSTP1 e GSTT1

Estudos relacionados com polimorfismos em genes de reparo sugerem que estes também apresentam importância na modulação de efeitos genotóxicos. Alguns trabalhos demonstram a influência destes polimorfismos

na atividade enzimática e a relação com a incidência de câncer, resposta a medicamentos quimioterápicos e radiosensibilidade (De Ruyck *et al.*, 2005; Efferth & Volm, 2005; Goode *et al.*, 2002; Norppa, 2001).

O sistema de reparo é dividido em vias, conforme o tipo de lesão em que ocorre, e em cada uma delas um grupo diferentes de enzimas é responsável pelo processo de reparo. Em humanos, foram descritas as seguintes vias: reversão do dano *in situ*, reparo por excisão de base (BER), reparo por excisão de nucleotídeo (NER), reparo de emparelhamento incorreto de bases (mismatch repair ou MMR), reparo em quebra na dupla fita (Recombinação Homóloga e Recombinação Não-Homóloga).

2. OBJETIVOS

No Rio Grande do Sul encontra-se grande parte das minas de carvão do Brasil, que têm sido cada vez mais exploradas como fonte de energia alternativa ao petróleo. Em nossa região, já foram demonstrados o efeito genotóxico e mutagênico da exposição ao carvão em diferentes espécies. Considerando a composição do carvão, conhecida por apresentar componentes genotóxicos, e a falta de estudos em trabalhadores expostos deste setor produtivo, este trabalho tem por objetivo geral realizar biomonitoramento de uma amostra de trabalhadores deste setor, da região de Candiota- Rio Grande do Sul.

1.7 Objetivo Específicos

- Avaliar os possíveis efeitos genotóxicos do carvão em trabalhadores de minas a céu aberto pelo Ensaio Cometa;
- Avaliar os possíveis efeitos mutagênicos do carvão em trabalhadores de minas a céu aberto pelo Teste de Micronúcleos em linfócitos e em mucosa oral;
- Determinar o grau de estresse oxidativo nos indivíduos expostos, pela peroxidação lipídica e pelas atividades do superóxido dismutase e catalase;
- Quantificar e/ou identificar a deposição de elementos inorgânicos (metais) no sangue dos mineiros através da técnica PIXE;
- Identificar os polimorfismos dos genes de metabolização *GSTT1*, *GSTM1*, e dos polimorfismos de reparo *OGG1*, *XRCC1*;
- Analisar a influência dos genótipos encontrados nos resultados dos biomarcadores de exposição e efeito.

CAPÍTULO II

ASSESSMENT OF THE OCCUPATIONAL RISK TO OPEN-CAST COAL MINE WORKERS

Manuscrito a ser submetido à *Ecotoxicology*

Assessment of the occupational risk to open-cast coal mine workers

Paula Rohr^a, Kátia Kvitko^{a,*}, Fernanda R. da Silva^a, Carem Porto^b, Merielen Sarmento^b, Natália Decker^b, Juliana Reyes^b, Mariangela da C. Allgayer^c, Tatiane Chao Furtado^c, Mirian Salvador^d, Catia Branco^d, Juliana da Silva^{b,*}

^a Laboratory of Immunogenetics, Postgraduate Program in Genetics and Molecular Biology (PPGBM), Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre-RS, Brazil

^b Laboratory of Genetic Toxicology, Postgraduate Program in Genetic Toxicology (PPGGTA), Lutheran University of Brazil (ULBRA), Canoas-RS, Brazil

^c Veterinary Clinical Pathology Laboratory, Lutheran University of Brazil, 92425-900, Canoas, RS, Brazil

^d Biotechnology Institute, University of Caxias do Sul, Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil;

*Corresponding authors:

Kátia Kvitko, Departamento de Genética e Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Caxias do Sul - RS, Brazil. E-mail: katia.kvitko@ufrgs.br

Juliana da Silva, Universidade Luterana do Brasil, ULBRA, Av. Farroupilha 8001, Prédio 1, Sala 122; 92425-900; Canoas, RS, Brazil. E-mail: juliana.silva@ulbra.br

ABSTRACT

Coal is an important fossil fuel used for the generation of energy. Coal dust is constituted primarily of hydrocarbons and metals. During coal extraction, large quantities of coal dust particles are emitted, contributing to environmental pollution. Coal miners are constantly exposed to coal dust and derivatives. The aim of the present study was to evaluate the potential genotoxic effects and oxidative stress in individuals from Candiota occupationally exposed to coal using the comet assay and the micronucleus in lymphocyte (MN) test. This study involved 128 individuals (men); 57 reported working at different jobs (non-exposed group), and 71 reported work that included exposure to coal. The exposed group presented significantly increased damage index and damage frequency (the comet assay parameters analyzed) and MN and nucleoplasmic bridge frequencies (the analyzed MN assay parameters) compared with non-exposed individuals ($P=0.002$, $P<0.001$, $P<0.001$ and $P<0.001$, respectively; Mann-Whitney U-test). Exposed individuals presented lower average levels of TBARS and CAT, while the mean SOD levels were higher in this group (both $P<0.001$ – Mann-Whitney U-test). A hematocrit analysis demonstrated the differences between the exposed and non-exposed groups; the exposed groups presented higher levels ($P=0.0119$). The evidence of a genetic hazard related to exposure to coal and its derivatives demonstrates the need for educational programs for coal miners to implement protection measures.

1. INTRODUCTION

Coal is an important fossil fuel used for energy generation. During coal extraction, large quantities of coal dust particles are emitted, contributing to environmental pollution. Brazil has approximately 12×10^9 tons of coal reserves, of which approximately 90% are in Rio Grande do Sul (RS), the southern most state. In this state, the coal is low quality, and extraction is performed in open-cast coal mines. The Candiota region, situated in the southeast of RS state, has the largest coal reserves in Brazil. The coal is used locally to generate electricity at the largest thermal power complex in the state. Consequently, a broad range of coal and derivatives is added to the chemical load of the atmosphere in the region.

Coal is a mixture of a variety of chemicals, especially hydrocarbons, which can give rise to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) (McDuffie et al.). All technological processes associated with open fire or temperatures between 400°C and 600°C, which may lead to PAHs, should be considered potentially hazardous [Srám et al., 1985]. Some PAHs, such as benz[a]anthracene, chrysene, benzo[a]pyrene, indeno[1,2,3-c,d] pyrene and benzo[g,h,i]perylene, are found in the Candiota region (Peralba 1990). In addition to hydrocarbons, coal contains high concentrations of various metals that are related to coal and activities such as mining and burning fossil fuels (McDaniel et al. 2005; Hopkins et al. 1999; Moriske et al. 1996). The exposure to many types of PAHs compounds and metals can lead to DNA damage (Cherng et al. 1996; Sutou 1996; da Silva et al. 2000).

Coal miners are constantly exposed to coal dust and its derivatives. Therefore, characterizing and estimating the risks of exposure are of extreme importance to the safety of individuals working in that environment (Chen et al. 2005). Several diseases have increased risks due to exposure to coal dust and products of combustion (Skowronek and Zemla 2003; Rockette 1977; Une et al. 1995; Beckman and Ames 1997; Schins et al. 1995; Schins and Borm 1999). A number of studies have shown that the parameters of oxidative damage are altered following inhalation of industrial particles such as coal (Pinho et al. 2004). Studies with coal mine workers have demonstrated higher levels of DNA

damage and chromosomal damage as evaluated by chromosomal aberration, micronucleus (MN) and sister chromatid exchange assays (Donbak et al. 2005; Sram et al. 1985; Leon-Mejia et al. 2011)

In Brazil, some studies have demonstrated genotoxic effects of coal exposure in different species, such as wild rodents, bats and land snails. Until now, the genotoxic effect was not evaluated in humans. Thus, the aim of the present study was to evaluate the potential genotoxic effects and oxidative stress in Candiota individuals occupationally exposed to coal using the comet assay and MN test.

2. MATERIALS & METHODS

2.1. Study population and sample collection

This study was approved by the Committee on Research Ethics at UFRGS (N. 2007978), and written informed consent was obtained from each individual before the research began.

Subjects from Candiota and Bagé were sampled from March of 2009 to March of 2012. Candiota is the city where the coal mine is situated, and Bagé is a neighboring city. This study involved a total of 128 individuals, including 57 non-exposed and 71 occupationally exposed to coal. The workers were from the Candiota open-cast coal mine, where they were involved with coal extraction and coal transport up to its arrival in the storage centers; all of them were exposed to large quantities of coal dust. All workers reported the use of some type of protection during the workday (gloves, breathing masks, glasses, waterproof boots, etc.). The non-exposed group consisted of individuals from Candiota and Bagé cities with no known exposure to genotoxic agents including coal, radiation, and chemicals.

Blood samples were collected by venipuncture using vacutainers with EDTA or heparin and processed as quickly as possible; blood cell samples were transported to the laboratories at or below 8°C and processed (DNA extraction) within 24 h of collection.

All individuals in the study were asked to answer a Portuguese-language version of a questionnaire from the International Commission for Protection against Environmental Mutagens and Carcinogens (Carrano and Natarajan 1988) and to participate in a face-to-face interview, which included standard demographic data (age, gender, etc.), as well as questions concerning medical issues (exposure to X-rays, vaccinations, medication, etc.), lifestyle (smoking, coffee and alcohol consumption, diet, etc.) and occupation (number of working hours per day, protective measures adopted - PPE). In all groups, individuals who smoked more than twenty cigarettes per day were considered smokers (Hoffmann et al. 2005).

2.2. Comet assay

The alkaline Comet assay was performed as described by (Singh et al. 1988) with the modifications suggested by (Tice et al. 2000). Blood cells (5 μ l) were embedded in 95 μ l of 0.75% low melting point agarose, and after agarose solidified, slides were placed in lysis buffer (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA and 10 mM Tris; pH 10.0–10.5) containing freshly added 1% (v/v) Triton X-100 and 10% (v/v) dimethyl sulphoxide for a minimum of 1 h and a maximum of one week. After treatment with lysis buffer, slides were incubated in freshly prepared alkaline buffer solution (300 mM NaOH and 1 mM EDTA; pH > 13) for 20 min, and DNA was submitted to electrophoresis for 20 min at 25 V (0.90 V/cm) and 300 mA, after which the buffer solution was neutralized with 0.4 M Tris (pH 7.5), and the DNA stained with ethidium bromide (2 μ g/ml). Electrophoresis procedure and the efficiency of each electrophoresis run were assessed using negative and positive internal controls, consisting of whole human blood collected in the laboratory, with the negative control being unmodified blood and the positive control 50 μ l blood mixed with 13 μ l (8×10^{-5} M) methyl methanesulphonate (CAS 66-27-3; Sigma, St Louis, MO, USA) and incubated for 2 h at 37°C. Each electrophoresis run was considered valid only if the negative and positive controls yielded the expected results. Slides were randomized and coded to blind the scorer. Images of 100 randomly selected

cells (50 cells from each of two replicate slides) were analysed for each individual using a fluorescence microscope equipped with a 12-nm BP546 excitation filter and a 590-nm barrier filter. Two parameters were evaluated: (i) damage index, 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 (see figures in Heuser *et al.* 2007) and whose values obtained for each individuals could range from 0 (0 × 100) to 400 (4 × 100), and damage frequency (DF), calculated as the percentage of damaged cells. International guidelines and recommendations for the Comet assay consider that visual scoring of comets is a well validated evaluation method. Although the DI parameter is subjective, it is highly correlated with computer-based image analysis (Tice *et al.* 2000; Collins 2004).

2.3. MN test: cytokinesis-blocked human lymphocyte micronucleus

For each blood sample, duplicate lymphocyte cultures were set up in culture flasks by adding 0.3 ml of whole blood to 5 ml of PB-MAX™ karyotyping medium (Invitrogen-GIBCO, Carlsbad, CA). The flasks were incubated at 37°C for 44 h before adding 5 µg/ml of cytochalasin B (Sigma), and the incubation was continued until the total time reached was 72 h, as described by Fenech (1993). After incubation, the lymphocytes were harvested by centrifugation at 1200 r.p.m. for 8 min, re-centrifuged, fixed in 3:1 (v/v) methanol/acetic acid, placed on a clean microscope slide and stained with 5% (v/v) Giemsa. For each blood sample, 2000 binucleated cells (BN) (i.e., 1000 from each of the two slides prepared from the duplicate cultures) were scored for MN, nucleoplasmic bridge (NPB) and nuclear bud (NBUD) presence by bright-field optical microscopy at a magnification of 200–1000x. All sides were coded for blind analysis.

2.4. Oxidative stress parameters

2.4.1. Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)

The TBARS concentration was measured spectrophotometrically, and the results are expressed as nmol mL^{-1} (Wills 1966).

2.4.2. Superoxide dismutase activity (SOD)

Superoxide dismutase activity was determined spectrophotometrically in serum samples by measuring the inhibition of the rate of auto-catalytic adrenochrome formation at 480 nm in a reaction medium containing a final concentration of 1 mmol L^{-1} adrenaline (pH 2.0) and 50 mmol L^{-1} glycine (pH 10.2) (Bannister and Calabrese 1987), both from E. Merck, with a resulting pH of 10.0. This reaction was conducted at a constant temperature of 30°C for 3 min. The enzymatic activity was expressed as superoxide dismutase units per gram of protein. One unit is defined as the amount of enzyme that inhibits the rate of adrenochrome formation by 50%.

2.4.3. Catalase activity (CAT)

The assay principle is based on the determination of the rate of hydrogen peroxide (E. Merck) decomposition at 240 nm (Aebi 1984). The reaction was conducted at a constant temperature (30°C) for 1 min. The enzymatic activity is expressed as catalase units per mg of protein. One unit of catalase decomposed $1 \mu\text{mol}$ of H_2O_2 per min at pH 7.4 and 30°C .

2.4.4. Total protein

The total protein levels were analyzed by the Biuret method (Kit Proteínas Totais – Labtest Diagnostica S. A., Brazil) for spectrophotometrical determination at 545 nm.

2.5. Hematocrit Analysis

The determination of erythroid cell volume, expressed in percentage, was carried out according to the microhematocrit method (ICSH 1980).

2.6. Statistical analysis

The normality of variables was evaluated using the Kolmogorov–Smirnov test. Student's *t*-test was used to compare the demographic characteristics of the studied populations. The statistical analysis of differences in parameters measured by the BMCyt assay was conducted using the Mann–Whitney *U* non-parametric test. Correlations between the different variables were determined by the Spearman rank correlation test when applicable. The critical level for rejection of the null hypothesis was considered to be a *P* value of 5%, two tailed. The analyses were performed with the GraphPad Prism version 5.00 program for Windows.

3. RESULTS

This study involved 128 individuals (men), 57 of whom reported working at different jobs (non-exposed group) and 71 of whom reported working in jobs with exposure to coal. No significant differences in average age were detected between the non-exposed (41.51 ± 15.04) and exposed groups (42.75 ± 8.45) (Student's *t*-test). The mean exposure time for the exposed group was 12.63 ± 7.87 years (time of experience in coal industry). All individuals in this study were intentionally selected to be non-smokers to eliminate confounding factors.

The comet assay and MN test parameters analyzed are presented in Table 1. Based on the comet assay results, the exposed group had significantly increased DI and DF compared with non-exposed individuals ($P=0.002$ and $P<0.001$, respectively; Mann-Whitney *U*-test). Significant differences were observed between the exposed and non-exposed group based on the parameters of the MN assay, the MN and nucleoplasmic bridge frequencies ($P<0.001$, Mann-Whitney *U*-test).

Figure 1 shows the distribution of damage classes in each group. Non-exposed individuals revealed higher frequencies in the number of cells in class 0 ($P=0.0009$), and the exposed group had increases in the number of cells in classes 1, 2 and 3 ($P=0.0016$, $P=0.042$ and $P=0.0087$, respectively).

No correlation was found with age and exposure time in relation to the different parameters of the comet assay and MN test (data not shown).

The oxidative stress results are presented in Table 2. Exposed individuals demonstrated lower average levels of TBARS and CAT, while the SOD mean levels are higher in this group (both $P<0.001$ – Mann-Whitney U-test).

A hematocrit analysis demonstrated differences between the exposed and non-exposed groups ($P=0.0119$). The exposed individuals had higher hematocrit levels (43.84 ± 4.72) when compared with the non-exposed individuals (41.37 ± 3.89).

4. DISCUSSION

Rio Grande do Sul (RS) state possesses the largest coal reserves in Brazil; however, to date, genotoxic endpoints related to coal open-cast extraction has only been evaluated in wild rodent populations (da Silva et al. 2000), demonstrating genotoxic effects of coal exposure.

This study investigated the potential genotoxic effects of occupational coal exposure in open-cast mines workers using the comet assay, MN test, and the blood antioxidant status. Our results demonstrated genotoxic and mutagenic effects in coal miners from RS. Increases in the features indicative of DNA damage using both the comet assay (DI and FD) and the MN test (micronucleated cells and nucleoplasmic bridges) were observed. The alkaline comet assay showed classes 1–2 as the most frequent damage classes observed. The cytokinesis-block micronucleus assay is a comprehensive system for measuring DNA damage, cytostasis and cytotoxicity (Fenech 2007). DNA damage events are scored specifically in once-divided binucleated cells

and include MN originates from chromosome fragments or whole chromosomes that lag behind at anaphase during nuclear division and nucleoplasmic bridges as biomarkers of DNA misrepair and/or telomere end-fusions (Fenech 2007).

Leon-Mejia et al. (2011) analyzing coal open-cast miners from Colombia, observed similar results for the comet assay and MN test. In the coal mine, the coal miners are potentially exposed to coal dust containing quartz, trace metals, inorganic minerals, and organic aromatic compounds. Chronic inhalation of coal dust in miners leads to several diseases, such as pneumoconiosis, progressive massive fibrosis, bronchitis, loss of lung function, emphysema and even stomach, liver and lung cancer (Skowronek and Zemla 2003; Rockette 1977; Une et al. 1995; Beckman and Ames 1997; Schins et al. 1995; Schins and Borm 1999), and constitutes one of the most important occupational health and safety risks of workers due to the potential synergistic toxic effects of this compound mixture (White 2002). Chronic inflammation leads to the generation of inflammatory factors, synthesis of extracellular matrix, fibroblast proliferation, and the production of oxidative stress, which is associated with the over-generation of reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) (Kadiiska et al. 1997), thus resulting in DNA damage (Ray et al. 2012). Damage caused by ROS is recognized by DNA glycosylases, AP endonucleases of the base excision repair (BER) mechanism, and in some cases, in particular by the nucleotide excision repair (NER) machinery, leading to DNA strand breaks (Sander and Wilson 2005).

DNA damage in miners' cells from Candiota could be associated with the concentrations of metal observed by PIXE by Rohr et al. (2012). In this study, an increase in magnesium, aluminum, copper, and zinc values were observed in Candiota coal miners' blood cells; phosphorous, sulfur, and lead values were increased in soil samples from Candiota. Rojas et al. (1996) suggest that metals induce DNA single strand breaks; this type of damage is soon repaired, but in chronic exposures, it can represent a form of continuing DNA damage. In addition, da Silva et al. (2000) and Dallarosa et al. (2005) demonstrated that environmental samples from Candiota had a high concentration of hydrocarbons. Polycyclic aromatic hydrocarbons can induce DNA lesions as

single-strand breaks via DNA repair mechanisms (Pavanello et al. 2005; Rojas et al. 2000; Brescia et al. 1999) and electrophilic metabolites that covalently interact with the DNA (Pereira-Neto et al. 2000; Singh et al. 2007) forming adducts with purines, especially guanine, after metabolic activation by enzymatic complex P450 (Baird et al. 2005).

In response to contaminants, various enzymatic and non-enzymatic antioxidant defenses protect cells and tissues from oxidative damage (Kinnula and Crapo 2003; Ray et al. 2012). Our results demonstrated higher levels of SOD in individuals exposed to coal that corresponds to an enzymatic response, whereas the results for CAT revealed lower levels in exposed individuals, suggesting this enzyme is not involved in coal exposure. However, the lower levels of TBARS in exposed individuals can be due chronic exposure, reducing the levels of lipid peroxidation. The formation of ROS from inflammatory cells is considered to be a biomarker of the genotoxicity of non-fibrous particles (coal dust). Previously, some authors showed an increased formation of 8-OHdG in peripheral blood lymphocytes and altered antioxidant capacities in the serum and red blood cells of coal miners (Schins and Borm 1999; Schins et al. 1995).

Hematocrit, a measurement of erythrocytes in whole blood, is also used as an indicator of oxygen and toxicant stress (Ajmani et al. 2003). Our study also demonstrated an increase in the percentage of hematocrit in exposed individuals when compared with non-exposed individuals. The oxidative stress contributes to changes in haemorheological parameters that may adversely affect tissue oxygen delivery and function, including increases in hematocrit, whole blood and plasma viscosity and red cell rigidity (Ajmani et al. 2003).

One of the challenges facing investigators has been the need to identify the individual compounds that may be responsible for the possible adverse effects associated with exposure to environmental agents. Although the significance of increased genotoxic effects is difficult to predict for individual subjects, the positive findings of biomonitoring studies suggest a genotoxic hazard at the group level. Genotoxic damage caused by chemical compounds can also be influenced by the individual inheritance of variant polymorphic genes involved in the metabolism of chemical compounds and in DNA repair

mechanisms. The evidence of a genetic hazard related to exposure to coal and its derivatives strongly suggests a need for educational programs for coal miners to implement protection measures.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

This work was financially supported by the Brazilian agencies Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; grant number 470772/2010-7) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS; grant number 10/0742-0).

6. REFERENCES

- Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105:121-126
- Ajmani RS, Fleg JL, Demehin AA, Wright JG, O'Connor F, Heim JM, Tarien E, Rifkind JM (2003) Oxidative stress and hemorheological changes induced by acute treadmill exercise. *Clin Hemorheol Microcirc* 28 (1):29-40
- Baird WM, Hooven LA, Mahadevan B (2005) Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action. *Environ Mol Mutagen* 45 (2-3):106-114. doi:10.1002/em.20095
- Bannister JV, Calabrese L (1987) Assays for superoxide dismutase. *Methods Biochem Anal* 32:279-312
- Beckman KB, Ames BN (1997) Oxidative decay of DNA. *J Biol Chem* 272 (32):19633-19636
- Brescia G, Celotti L, Clonfero E, Neumann GH, Forni A, Foa V, Pisoni M, Ferri GM, 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 (8-9):431-439
- Carrano AV, Natarajan AT (1988) International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens. ICPEMC publication no. 14. Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. *Mutat Res* 204 (3):379-406
- Chen Y, Shah N, Huggins FE, Huffman GP (2005) Transmission electron microscopy investigation of ultrafine coal fly ash particles. *Environ Sci Technol* 39 (4):1144-1151

- Cherng SH, Lin ST, Lee H (1996) Modulatory effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on the mutagenicity of 1-nitropyrene: a structure-activity relationship study. *Mutat Res* 367 (4):177-185
- Collins AR (2004) The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol* 26 (3):249-261. doi:MB:26:3:249 [pii]
- 10.1385/MB:26:3:249
- da Silva J, de Freitas TR, Heuser V, Marinho JR, Erdtmann B (2000) Genotoxicity biomonitoring in coal regions using wild rodent *Ctenomys torquatus* by Comet assay and micronucleus test. *Environ Mol Mutagen* 35 (4):270-278
- Dallarosa JB, Teixeira EC, Pires M, Fachel J (2005) Study of the profile of polycyclic aromatic hydrocarbons in atmospheric particles (PM10) using multivariate methods. *Atmospheric Environment* 39 (35):10
- Donbak L, Rencuzogullari E, Yavuz A, Topaktas M (2005) The genotoxic risk of underground coal miners from Turkey. *Mutat Res* 588 (2):82-87
- Fenech M (1993) The cytokinesis-block micronucleus technique and its application to genotoxicity studies in human populations. *Environ Health Perspect* 101 Suppl 3:101-107
- Fenech M (2007) Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat Protoc* 2 (5):1084-1104. doi:nprot.2007.77 [pii]
- 10.1038/nprot.2007.77
- Hoffmann H, Hogel J, Speit G (2005) The effect of smoking on DNA effects in the comet assay: a meta-analysis. *Mutagenesis* 20 (6):455-466
- Hopkins WA, Mendonca MT, Congdon JD (1999) Responsiveness of the hypothalamo-pituitary-interrenal axis in an amphibian (*Bufo terrestris*) exposed to coal combustion wastes. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 122 (2):191-196
- ICSH (1980) Recommendation for reference method for determination by centrifugation of packed cell volume of blood. International Committee for Standardization in Haematology Expert Panel on Blood Cell Sizing. *J Clin Pathol* 33 (1):1-2
- Kadiiska MB, Mason RP, Dreher KL, Costa DL, Ghio AJ (1997) In vivo evidence of free radical formation in the rat lung after exposure to an emission source air pollution particle. *Chem Res Toxicol* 10 (10):1104-1108. doi:10.1021/tx970049r
- tx970049r [pii]
- Kinnula VL, Crapo JD (2003) Superoxide dismutases in the lung and human lung diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 167 (12):1600-1619. doi:10.1164/rccm.200212-1479SO
- 167/12/1600 [pii]

- Leon-Mejia G, Espitia-Perez L, Hoyos-Giraldo LS, Da Silva J, Hartmann A, Henriques JA, 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 (4):686-691
- McDaniel BB, Jones RA, Scherz H, Kirsch AJ, Little SB, Grattan-Smith JD (2005) Dynamic contrast-enhanced MR urography in the evaluation of pediatric hydronephrosis: Part 2, anatomic and functional assessment of uteropelvic junction obstruction. *AJR Am J Roentgenol* 185 (6):1608-1614. doi:185/6/1608 [pii]
- 10.2214/AJR.04.1574
- McDuffie HH, Pahwa P, Robson D, Dosman JA, Fincham S, Spinelli JJ, McLaughlin JR (2005) Insect repellents, phenoxyherbicide exposure, and non-Hodgkin's lymphoma. *J Occup Environ Med* 47 (8):806-816. doi:00043764-200508000-00006 [pii]
- Moriske HJ, Drews M, Ebert G, Menk G, Scheller C, Schondube M, Konieczny L (1996) Indoor air pollution by different heating systems: coal burning, open fireplace and central heating. *Toxicol Lett* 88 (1-3):349-354
- 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 (1):169-175. doi:bgh303 [pii]
- 10.1093/carcin/bgh303
- Peralba MCR (1990) Caracterização química dos hidrocarbonetos de betumes de carvões sul-brasileiros. Universidade de São Paulo, São Carlos
- Pereira-Neto AD, Moreira JC, Dias AEXO, Arbilla G, Ferreira LFV, Oliveira AS, Barek J (2000) Avaliação da Contaminação Humana por Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAS) e seus Derivados Nitrados (NHPAS): Uma Revisão Metodológica. *Quim Nova* 23:9
- Pinho RA, Bonatto F, Andrades M, Frota ML, Jr., Ritter C, Klamt F, Dal-Pizzol F, Uldrich-Kulczynski JM, Moreira JC (2004) Lung oxidative response after acute coal dust exposure. *Environ Res* 96 (3):290-297. doi:10.1016/j.envres.2003.10.006
- S001393510300197X [pii]
- Ray PD, Huang BW, Tsuji Y (2012) Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal* 24 (5):981-990. doi:S0898-6568(12)00013-7 [pii]
- 10.1016/j.cellsig.2012.01.008
- Rockette HE (1977) Cause specific mortality of coal miners. *J Occup Med* 19 (12):795-801
- Rohr P, da Silva J, da Silva FR, Sarmiento M, Porto C, Ancines C, Kvitko K (2012) Evaluation of genetic damage in coal open-cast mining workers

using buccal micronucleus cytome assay and its correlation with GSTM1 and GSTT1 polymorphisms. In preparation

- Rojas E, Valverde M, Sordo M, Altamirano-Lozano P, Ostrosky-Wegman P (1996) Single cell gel electrophoresis assay in the evaluation of metal carcinogenicity. In: Collery P, Corbella J, Domingo JL, Etienne J-C, Llobet JM (eds) *Metal Ions in Biology and Medicine*. John Libbey Eurotext, Spain, pp 375-377
- Rojas M, Cascorbi I, Alexandrov K, Kriek E, Auburtin G, Mayer L, Kopp-Schneider A, Roots I, Bartsch H (2000) Modulation of benzo[a]pyrene diolepoxide-DNA adduct levels in human white blood cells by CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 polymorphism. *Carcinogenesis* 21 (1):35-41
- Sander M, Wilson S (2005) Base Excision Repair, AP Endonucleases and DNA Glycosylases. . In: eLS. John Wiley & Sons Ltd, Chichester.
- Schins RP, Borm PJ (1999) Mechanisms and mediators in coal dust induced toxicity: a review. *Ann Occup Hyg* 43 (1):7-33
- Schins RP, Schilderman PA, Borm PJ (1995) Oxidative DNA damage in peripheral blood lymphocytes of coal workers. *Int Arch Occup Environ Health* 67 (3):153-157
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175 (1):184-191. doi:0014-4827(88)90265-0 [pii]
- Singh R, Sram RJ, Binkova B, Kalina I, Popov TA, Georgieva T, Garte S, Taioli E, Farmer PB (2007) The relationship between biomarkers of oxidative DNA damage, polycyclic aromatic hydrocarbon DNA adducts, antioxidant status and genetic susceptibility following exposure to environmental air pollution in humans. *Mutat Res* 620 (1-2):83-92. doi:S0027-5107(07)00106-6 [pii]
- 10.1016/j.mrfmmm.2007.02.025
- Skowronek J, Zemla B (2003) Epidemiology of lung and larynx cancers in coal mines in Upper Silesia--preliminary results. *Health Phys* 85 (3):365-370
- Sram RJ, Hola N, Kotesovec F, Novakova A (1985) Cytogenetic analysis of peripheral blood lymphocytes in glass workers occupationally exposed to mineral oils. *Mutat Res* 144 (4):277-280
- Sutou S (1996) Achievements by CSGMT/JEMS.MMS: the Collaborative Study Group for the Micronucleus Test in the Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan. *Mutat Res* 340 (2-3):151-174
- Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF (2000) Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 35 (3):206-221. doi:10.1002/(SICI)1098-2280(2000)35:3<206::AID-EM8>3.0.CO;2-J [pii]

- Une H, Esaki H, Osajima K, Ikui H, Kodama K, Hatada K (1995) A prospective study on mortality among Japanese coal miners. *Ind Health* 33 (2):67-76
- White PA (2002) The genotoxicity of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in complex mixtures. *Mutat Res* 515 (1-2):85-98. doi:S1383571802000177 [pii]
- Wills ED (1966) Mechanisms of lipid peroxide formation in animal tissues. *Biochem J* 99 (3):667-676

Table 1. Cytogenetic parameters (mean \pm S.D.) of unexposed individuals and workers exposed to coal.

Cytogenetic parameters	Non-Exposed (n=57)	Workers (n=71)
Comet assay (100 leukocytes/subject)		
Damage index	15.53 \pm 8.80	33.69 \pm 28.70 ^a
Damage frequency	12.40 \pm 6.18	27.46 \pm 23.75 ^a
MN tests (2000 cells/subject)		
MN	3.94 \pm 3.31	7.92 \pm 4.53 ^b
Buds	4.35 \pm 2.63	5.06 \pm 3.80
Nucleoplasmic bridges	3.68 \pm 2.68	12.42 \pm 7.78 ^b

^a Data significant in relation to the non-exposed group at $P = 0.002$ - Mann-Whitney U -test.

^b Data significant in relation to the non-exposed group at $P < 0.001$ - Mann-Whitney U -test.

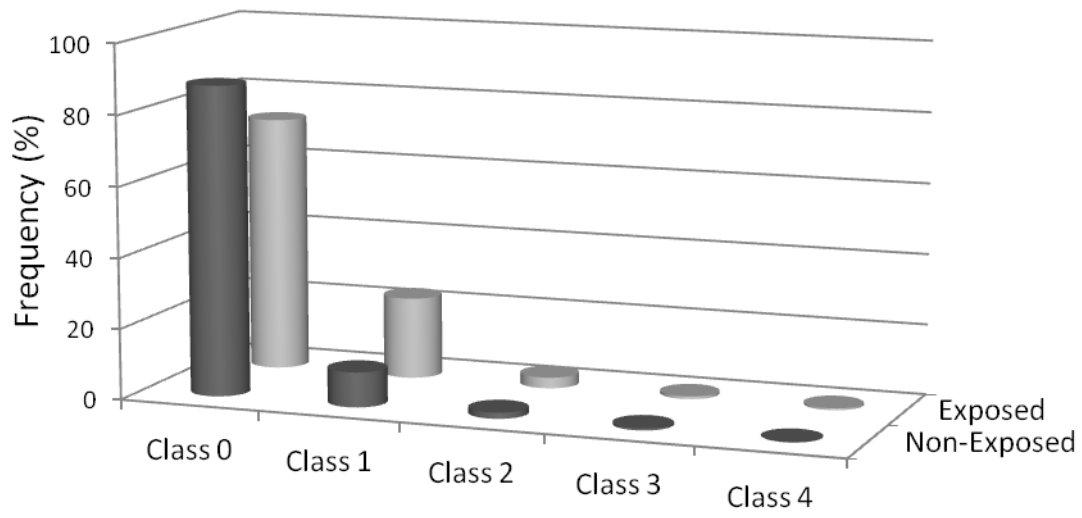


Figure 1. Frequencies of the damage classes observed using the comet assay.

Table 2. Oxidative stress marker analysis of non-exposed and coal-exposed individuals.

Oxidative stress	Non-Exposed (n=57)	Workers (n=71)
TBARS (nm/mg protein)	10.30 ± 4.81	5.94 ± 1.90 ^a
SOD (U/g protein)	50.26 ± 25.17	81.60 ± 14.39 ^a
CAT (U/mg protein)	2.13 ± 1.31	0.84 ± 0.87 ^a

^aData significant in relation to non-exposed group at P < 0.001 (Mann-Whitney - U test).

CAPÍTULO III

EVALUATION OF GENETIC DAMAGE IN OPEN- CAST COAL MINE WORKERS USING THE BUCCAL MICRONUCLEUS CYTOME ASSAY AND ITS CORRELATION WITH GSTM1 AND GSTT1 POLYMORPHISMS

**Manuscrito a ser submetido à *Environmental and
Molecular Mutagenesis***

Evaluation of genetic damage in open-cast coal mine workers using the buccal micronucleus cytome assay and its correlation with GSTM1 and GSTT1 polymorphisms

DNA damage in coal open-cast mining workers

Paula Rohr^a, Juliana da Silva^{b*}, Camile Ancines^a, Fernanda R. da Silva^a, Merielen Sarmiento^b, Carem Porto^b, Johny F. Dias^c, Carla E. I. dos Santos^c, Kátia Kvitko^{a*}

^a Postgraduate Programme in Genetics and Molecular Biology (PPGBM), Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre-RS, Brazil

^b Laboratory of Genetic Toxicology, Postgraduate Programme in Genetic Toxicology (PPGGTA), Lutheran University of Brazil (ULBRA), Canoas-RS, Brazil

^c School of Physics, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

*Corresponding authors:

Kátia Kvitko, Departamento de Genética e Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Caxias do Sul - RS, Brazil. E-mail: katia.kvitko@ufrgs.br

Juliana da Silva, Universidade Luterana do Brasil, ULBRA, Av. Farroupilha 8001, Prédio 1, Sala 122; 92425-900; Canoas, RS, Brazil. E-mail: juliana.silva@ulbra.br

Abstract

Candiota is situated in the southeast of the state of Rio Grande do Sul, about 400 km from Porto Alegre and 50 km from the Uruguayan border and, has the largest coal reserves in Brazil. The coal from open cast mines is used locally to generate electricity at the largest thermal power complex in the state. The coal miners are constantly exposed to coal dust. This exposure increases a risk to development of several diseases. The human buccal micronucleus (MN) cytome assay (BMCyt) has been more used to investigate biomarkers for DNA damage, cell death and basal cell frequency in buccal cells. Glutathione S-transferases are the major groups of phase II detoxifying enzymes, having evolved to provide organic protection against substances present in the environment, and so, polymorphisms in *GST* genes are susceptibility biomarkers. The aim of this study was assess if prolonged exposure to coal dust could lead to an increase in genomic instability, cell death and frequency of basal cells by BMCyt. In order to verify the relationship between genetic susceptibility and biomarkers *GSTT1 null*, *GSTM1 null* polymorphisms were evaluated. In analysis of epithelial cells, exposed group presented a significantly higher frequencies of basal cells ($P < 0.001$), of micronucleus in basal ($P < 0.001$) and differentiated cells ($P < 0.001$), as well as binucleated cells ($P < 0.05$), compared to the non-exposed group. The exposed group showed a significantly lower frequency of condensed chromatin cells than non-exposed group ($P < 0.001$). These high levels of DNA damage in blood cells of coal workers from Candiota could be associated with concentrations of metals observed by PIXE. DNA damage observed in the exposed mining workers may be a consequence of oxidative damage resulting from coal residue mixtures, including metals. Besides, our results confirm the BMCyt assay as good biomarker to occupational exposure.

1. Introduction

Candiota is situated in the southeast of the state of Rio Grande do Sul, approximately 400 km from Porto Alegre and 50 km from the Uruguayan border. Candiota has the largest coal reserves in Brazil. The coal from open-cast mines is used locally to generate electricity at the largest thermal power complex in the state. Coal is the largest fossil fuel source used for the generation of energy. However, coal extraction and use constitute an important pollution factor, and thus, risk characterization and estimation are extremely important for the safety of coal workers and the environment. During coal extraction, large quantities of coal dust particles are emitted, contributing to environmental pollution. Coal residues consist of a mixture of substances, including carbon, hydrogen, nitrogen, oxygen, sulfur, mineral particles of smaller size and inorganic compounds in the ash (Chen et al. 2005).

Coal miners are constantly exposed to coal dust. This exposure increases the risk of development of several diseases, such as pneumoconiosis, progressive massive fibrosis, bronchitis, loss of lung function, emphysema and even stomach, liver and lung cancer (Beckman and Ames 1997; Rockette 1977; Schins and Borm 1999; Schins et al. 1995; Skowronek and Zemla 2003; Une et al. 1995). Studies of coal miners using chromosomal aberration, micronucleus (MN) and sister chromatid exchange assays have revealed higher levels of DNA and chromosomal damage (Donbak et al. 2005; Leon-Mejia et al. 2011; Sram et al. 1985).

A wide range of methods are currently used for the detection of the early biological effects of DNA-damaging agents in occupational settings. In recent years, the human buccal micronucleus (MN) cytome assay (BMCyt) has been increasingly used to investigate biomarkers for DNA damage, cell death and basal cell frequency in buccal cells (Holland et al. 2008). This growing use may be explained by the relative technical simplicity of the assay and the variety of complementary toxicological endpoints evaluated (Bonassi et al. 2011).

Individual variations in polymorphic genes involved in xenobiotic metabolism and DNA repair were linked to an increased risk of cancer (Wilkinson and Clapper 1997). These individual differences may be important in the estimation of the risk to humans caused by the exposure to environmental toxicants. Glutathione S- transferases are the major groups of phase II detoxifying enzymes, having evolved to provide organic protection against substances present in the environment (Wilkinson and Clapper 1997). *GSTT1* and *GSTM1* polymorphisms caused by gene deletions result in null alleles, and individuals homozygous for deletions lack enzyme activity. These GST gene polymorphisms were associated with several diseases, such as cancers and auto-immune diseases, in which the etiology is related to the exposure to environmental hazards (Honma et al. 2008; Rohr et al. 2008; Sreeja et al. 2008).

In the present study, we used BMCyt to assess whether prolonged exposure to coal dust could lead to an increase in genomic instability, cell death and the frequency of basal cells. To determine whether genetically determined individual variations in metabolizing capacity can modify individual susceptibility to the possible genotoxic effects of pesticides, the subjects were genotyped for *GSTT1* and *GSTM1* null polymorphisms.

2. Methods

2.1. Study population and sample collection

This study was approved by the Committee on Research Ethics at UFRGS (N. 2007978), and written informed consent was obtained from each individual before the research began.

Subjects from Candiota and Bagé were sampled from March of 2009 to March of 2012. Candiota is the city where the coal mine is situated, and Bagé is a neighboring city. This study involved a total of 70 individuals, 29 non-exposed

and 41 occupationally exposed to coal. The workers were from a Candiota open-cast coal mine, where they were involved with coal extraction and coal transport up to its arrival at the storage centers; all of the workers were exposed to large quantities of coal dust. All workers reported using some kind of protection during the workday (gloves, breathing masks, glasses, waterproof boots, etc.). The non-exposed group consisted of individuals from Candiota and Bagé cities with no known exposure to genotoxic agents, including coal, radiation or chemicals.

Blood samples were collected by venipuncture using vacutainers with EDTA and processed as quickly as possible; blood cell samples were transported to the laboratories at or below 8°C and processed (DNA extraction) within 24 h of collection.

All individuals in the study were asked to answer a Portuguese-language version of a questionnaire from the International Commission for Protection against Environmental Mutagens and Carcinogens (Carrano and Natarajan 1988) and to participate in a face-to-face interview, which included standard demographic data (age, gender, etc.) and questions concerning medical issues (exposure to X-rays, vaccinations, medication, etc.), life style (smoking, coffee and alcohol consumption, diet, etc.) and occupation (number of working hours per day, protective measures adopted - PPE). In all groups, the individuals who smoked more than twenty cigarettes per day were considered smokers (Hoffmann et al. 2005).

2.2. Buccal micronucleus cytome assay (BMCyt assay)

Buccal cell samples were obtained by gently rubbing the inside of the cheeks (right and left side) with a cytobrush, which was immersed in 5 ml of cold saline (0.9% (w/v) aqueous NaCl) in a conical tube and transported under refrigeration to the laboratory, where the saline was centrifuged at 1500 rpm for 8 min and the sedimented buccal cells were washed twice more with saline and once more with Carnoy's fixative (methanol and glacial acetic acid 3:1) under the same centrifugation conditions. The cell suspension was dropped onto a

slide and allowed to air dry. The slides were stained with 2% Giemsa solution for 10 min, rinsed in distilled water and air dried. For each individual, the frequency of the various cell types in the assay is represented as the number of cells in 2,000, as suggested by Thomas et al. (2009).

2.3. GSTs Genotyping

Genomic DNA was isolated from whole blood by the salting out method (Lahiri and Nurnberger 1991). The GSTM1 and GSTT1 genes were genotyped by a multiplex PCR method using a reaction mixture consisting of 100 ng of genomic DNA, 15 pmol of each primer, 10 mM Tris HCl, 4.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 100 mM dNTPs and 1.0 U of Taq DNA polymerase (Invitrogen Corporation, San Diego, CA, USA) in a total volume of 50 µl. The amplification protocol consisted of initial denaturation at 94°C for 5 min; 6 touchdown cycles of 1 min at 94°C followed by 2 min at 59°C (decreasing to 54°C at a rate of 1°C per cycle) and 1 min at 72°C; and 30 cycles at 94°C for 1 min followed by 1 min at 55°C and 1 min at 72°C; with a final 5 min extension step at 72°C. An aliquot of the amplified product was subjected to horizontal agarose gel (3.5%) electrophoresis to verify the presence or absence of the GSTM1 and GSTT1 fragments. The GSTP1 product was used as a control for this reaction. The primer sequences have been previously reported (Bell et al. 1993; Pemble et al. 1994).

2.4. Chemical Analysis

The trace element content in total blood from the coal miners and non-exposed group was analyzed, as were soil samples from Candiota (geographic coordinates: 31°34'11.7"S/53°41'46.9"W) and Bagé (31°19'53"S/54°06'25"W).

Soil samples at a depth of 20 cm were collected using a spade from 5 random locations in July of 2010; gravel, stones and plant materials were removed from the samples. The subsamples were homogenized in order to form a composite sample for each sampling area. Approximately 500 g to 1 kg

of surface soil was collected using stainless spatulas, placed in a glass container protected from light, and maintained at 4°C until sample preparation.

Briefly, dried samples were well homogenized and pressed into thick pellets, which were placed in the target holder inside the reaction chamber. During the experiments, the pressure inside the reaction chamber was approximately 10⁻⁵ mbar. The experiments were carried out at the Ion Implantation Laboratory of the School of Physics, Federal University of Rio Grande do Sul (IF-UFRGS). A 3-MV Tandatron accelerator provided a 2.0-MeV proton beam with an average current of 5 nA at the target. The X-rays produced in the samples were detected by a germanium (Ge) detector with an energy resolution of approximately 180 eV in 5.9 keV, with high efficiency between 3 and 100 keV. The spectra were analyzed with the GUPIX software package, and the data are expressed as parts per million (ppm) (Campbell et al. 2000).

2.5. Statistical analysis

The normality of variables was evaluated by the Kolmogorov–Smirnov test. The statistical analysis of differences in parameters measured by the BMCyt assay was carried out using the Mann–Whitney U non-parametric test. Correlations between different variables were determined by the Spearman rank correlation test when applicable. The effect of the *GST* genotype on the exposed groups was investigated using the Mann–Whitney U non-parametric test. The critical level for rejection of the null hypothesis was considered to be a P value of 5%, two tailed. The analyses were performed with GraphPad Prism version 5.00 for Windows software.

3. Results

No significant difference in average age was detected between the non-exposed (46.69 ± 18.11) and exposed groups (36.86 ± 14.00) (t-test). The mean exposure time for the exposed group was 13.83 ± 8.12 years (time of experience in coal). No smokers were included in these groups.

The results of the BMCyt assay are presented in Table 1. The evaluation of epithelial cells revealed a higher frequency of basal cells in the coal dust-exposed individuals than in the non-exposed group ($P < 0.001$ – Mann-Whitney U-test). The exposed group presented a significantly higher number of micronuclei in basal cells ($P < 0.001$), micronuclei in differentiated cells ($P < 0.001$), and binucleated cells ($P < 0.05$) as compared with the non-exposed group. The exposed group demonstrated a significantly lower frequency of cells with condensed chromatin than the non-exposed group ($P < 0.001$). No correlation was found between age and exposure time in relation to the parameters tested by the BMCyt assay (Data not shown).

Table 2 presents the cross-correlation analysis between the biomarkers of the BMCyt assay for all individuals in this study. Basal cells showed a positive correlation with MN in basal cells ($r = 0.512$, $P < 0.0001$) and MN in differentiated cells ($r = 0.722$, $P < 0.0001$), binucleated cells ($r = 0.352$, $P = 0.003$), and karyorrhectic cells ($r = 0.266$, $P = 0.026$). Differentiated cells with MN demonstrated a positive correlation with MN in basal cells ($r = 0.519$, $P < 0.0001$), binucleated cells ($r = 0.327$, $P = 0.006$), and karyorrhectic cells ($r = 0.331$, $P < 0.0001$). Karyolytic cells had a positive correlation with karyorrhectic cells ($r = 0.188$, $P = 0.024$). Condensed chromatin cells showed a negative correlation with basal cells ($R = -0.654$, $P < 0.0001$), MN in basal cells ($r = -0.302$, $P = 0.011$), and MN in differentiated cells ($r = -0.498$, $P < 0.0001$).

Table 3 demonstrates the effect of individual *GSTM1* and *GSTT1* genotypes on regenerative potential, DNA damage and cell death in the exposed individuals as evaluated by the BMCyt assay. Although individuals with *GSTM1* and *GSTT1* null genotypes presented higher levels of regenerative potential, DNA damage and cell death, these differences were not significant.

The results of the chemical analyses performed via the PIXE technique to characterize the metal content in blood and soil samples are shown in Tables 4 and 5, respectively. No significant difference was observed between blood samples from coal workers and the non-exposed group. Among metals, the most representative were magnesium, aluminum, copper, and zinc. Phosphorous, sulfur, and lead were significantly higher in soil from Candiota than Bagé (P <0.001).

4. Discussion

Mineral coal in Rio Grande do Sul (RS), the southern state of Brazil, exceeds 32×10^9 tons, representing approximately 89% of the Brazilian reserves. This region produces 38% of the country's coal. Open-cast coal mine workers are potentially exposed to coal dust containing quartz, trace metals, inorganic minerals, and organic aromatic compounds (Leon et al. 2007). Epidemiological studies have been performed with people exposed to mixed coal dust, revealing increased risks for the development of respiratory diseases, such as pneumoconiosis, progressive massive fibrosis, bronchitis, loss of lung function, and emphysema, as well as the development of stomach, liver and lung cancer (Beckman and Ames 1997; Rockette 1977; Schins and Borm 1999; Schins et al. 1995; Skowronek and Zemla 2003; Une et al. 1995). There are only a few studies on the occupational hazard effects (genotoxicity) for coal miners; in RS, genotoxic endpoints related to open-cast coal extraction has only been evaluated in rodent populations (da Silva et al. 2000).

In this study, the BMCyt assay was used to investigate biomarkers for DNA damage, cell death and regenerative potential in the buccal cells of non-exposed and coal dust-exposed groups (Table 1). This study is the first to use the BMCyt assay to evaluate all possible endpoints in coal miners. Kumar *et al.* (Kumar et al. 2011) utilized the buccal cells to analyze the genotoxic effect of coal dust only in relation to MN frequencies in differentiated cells.

Results obtained from buccal cells revealed statistically significant increases in micronuclei and binucleated cells in differentiated cells and in

micronuclei in basal cells among the coal workers. In our study, there was no correlation between age and time of service in relation to the BMCyt parameters. Biomonitoring studies of the peripheral lymphocytes of coal workers demonstrated increased adduct formation and increases of non-cellular and cellular sources of reactive oxygen species, which can induce oxidative DNA damage (Celik et al. 2007; Donbak et al. 2005; Leon-Mejia et al. 2011; Schins et al. 1995; Schoket et al. 1999). Other studies using different assays have also demonstrated higher levels of DNA damage in individuals exposed to coal. In buccal cells, Kumar *et al.* (2011) observed higher frequencies of MN in individuals exposed to coal. Micronuclei are formed mainly from chromatids or chromosome fragments, which remain excluded from the main cell nucleus following mitosis (Holland et al. 2008), indicating an increased risk of cancer (He et al. 2000). Buccal cells are in constant contact with the environment, which suggests that the oral epithelium is an important target site for the toxicants in dust; therefore, our results revealed higher genotoxicity in coal workers (higher micronucleus frequency in differentiated and basal cells) compared with the unexposed group due to the coal workers' exposure to coal dust.

Binucleated cells were also found to be more frequent in the exposed group. The precise significance of these cells is not known, but they may be indicative of cytokinesis failure. As shown in a study using the BMCyt assay to study Down Syndrome (Thomas et al. 2008), the binucleate/mononucleate ratio could be an important biomarker for identifying individuals with cytokinesis failure caused by higher than normal rates of aneuploidy. Aneuploidy stands out as a consistent marker of malignancy (Sanchez-Siles et al. 2011).

The proportion of basal cells in buccal cells is an indication of the regenerative capacity of this tissue (Thomas et al. 2009). In this study, the exposed group demonstrated higher frequencies of basal cells compared with the non-exposed group. It has been postulated that repeated exposure to cytotoxic agents can result in chronic cell injury, compensatory cell proliferation (regenerative capacity), hyperplasia, and ultimately tumor development (Mally and Chipman 2002; Swenberg 1993).

The cell death analyses revealed a lower frequency of cells with condensed chromatin in the exposed group. An increased percentage of cells with condensed chromatin cells occurs in the pre-keratinization process (Pindborg et al. 1980) and represents cytotoxicity (Thomas et al. 2008). Thus, it is believed that this cell type increase in unexposed individuals must have occurred at random.

The results of the cross-correlation study suggest a significant positive relationship between basal cells, binucleated cells, karyorrhectic cells, karyolytic cells, and cells with micronuclei. The positive correlation between basal cells and karyorrhectic cells suggests that the latter are derived directly from basal cells, similar to the observations of Thomas *et al.* (2008).

The primary target cells of inhaled coal dust particles are macrophages and epithelial cells. Activated macrophages (phagocytosis toxicity) produce excessive amounts of reactive oxygen species (ROS) and cytokines. ROS are believed to play a major role in the primary genotoxicity of particles, which may derive from their surface properties, the presence of transition metals, intracellular iron mobilization, and/or lipid peroxidation (Schins 2002). In vitro studies have led to the identification of the primary genotoxic properties of particles, whereas recent in vivo studies provide further support for the correlation between particle-induced lung inflammation and secondary genotoxicity. The formation of ROS from inflammatory cells is considered to be a biomarker of the genotoxicity of non-fibrous particles (coal dust). Previously, some authors observed increased formation of 8-OHdG in peripheral blood lymphocytes and altered antioxidant capacities in the serum and red blood cells of coal miners (Schins and Borm 1999; Schins et al. 1995). When there is excessive production of ROS, or when there are insufficient in vivo defense mechanisms, oxidative stress may occur. This stress may result in DNA damage, lipid peroxidation, protein modification, membrane disruption, and mitochondrial damage (Zhai et al. 2002); all of these modifications are capable of affecting cytogenetic damage levels.

These high levels of DNA damage in the blood cells of coal workers from Candiota could be associated with the metal concentrations observed by

PIXE. The mechanisms of metal-induced carcinogens are still unknown, but one possible pathway may involve the induction of DNA damage (Rojas et al., 1996). Although our analyses in blood samples revealed no difference in metal concentrations between the exposed and non-exposed groups, higher concentrations of magnesium, aluminum, copper, and zinc were observed in coal miner cells than in non-exposed individuals. In addition, soil samples from Candiota demonstrated significant increases of phosphorous, sulfur, and lead.

Finally, DNA damage in the exposed mine workers may be a consequence of oxidative damage resulting from coal residue mixtures containing metals and polycyclic aromatic hydrocarbons (Pahlich). Da Silva et al. (2000) and Dallarosa et al. (2005) demonstrated that environmental samples from Candiota had a high concentration of hydrocarbons. All technological processes associated with open fire or temperatures between 400° and 600°C, which may lead to PAH, should be considered potentially hazardous (Sram et al. 1985). PAH can induce DNA lesions as single-strand breaks via DNA repair mechanisms (Brescia et al. 1999; Pavanello et al. 2005); and electrophilic metabolites that covalently interact with the DNA (Singh et al. 2007) can form adducts with purines, especially with guanine, after metabolic activation by enzymatic complex P450 (Baird et al. 2005).

In our study, we observed that genetic polymorphisms of the *GSTM1* and *GSTT1* genotypes do not affect the MN frequency or other BMCyt parameters, except for the buds frequency. Significant increases in buds frequencies in differentiated cells were observed in the *GSTM1* null genotype individual compared with individuals with non-null *GSTM1*. As in our results, Rossi et al. (2009) did not find a significant association between GST genotypes and a biomarker of effect. The mechanism triggering nuclear bud formation is unknown but may be related to the elimination of amplified DNA or DNA repair complexes (Shimizu et al. 2005).

Occupational hazard effects in coal miners, in relation to DNA damage, were observed when compared with the non-exposed group. Because of the complex mixture in occupational coal mining environments, it is difficult to relate genotoxic effects to a specific agent or compound. The DNA damage observed

in the exposed mine workers may be a consequence of oxidative damage resulting from coal residue mixtures, including metals. Our results also confirmed the value of the BMCyt assay as a biomarker for occupational exposure.

5. Acknowledgements

This work was supported by grants from the Brazilian Agencies Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and Lutheran University of Brazil (ULBRA).

6. References

- Baird WM, Hooven LA, Mahadevan B. 2005. Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action. *Environ Mol Mutagen* 45(2-3):106-114.
- Beckman KB, Ames BN. 1997. Oxidative decay of DNA. *J Biol Chem* 272(32):19633-19636.
- Bell DA, Taylor JA, Paulson DF, Robertson CN, Mohler JL, Lucier GW. 1993. Genetic risk and carcinogen exposure: a common inherited defect of the carcinogen-metabolism gene glutathione S-transferase M1 (GSTM1) that increases susceptibility to bladder cancer. *J Natl Cancer Inst* 85(14):1159-1164.
- Bonassi S, Coskun E, Ceppi M, Lando C, Bolognesi C, Burgaz S, Holland N, Kirsh-Volders M, Knasmueller S, Zeiger E, Carnesoltas D, Cavallo D, da Silva J, de Andrade VM, Demircigil GC, Dominguez Odio A, Donmez-Altuntas H, Gattas G, Giri A, Giri S, Gomez-Meda B, Gomez-Arroyo S, Hadjidekova V, Haveric A, Kamboj M, Kurteshi K, Martino-Roth MG, Montero Montoya R, Nersesyan A, Pastor-Benito S, Favero Salvadori DM, Shaposhnikova A, Stopper H, Thomas P, Torres-Bugarin O, Yadav AS, Zuniga Gonzalez G, Fenech M. 2011. The HUMAN MicroNucleus project on exfoliated buccal cells (HUMN(XL)): the role of life-style, host factors, occupational exposures, health status, and assay protocol. *Mutat Res* 728(3):88-97.
- Brescia G, Celotti L, Clonfero E, Neumann GH, Forni A, Foa V, Pisoni M, Ferri GM, 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(8-9):431-439.

- Campbell JL, Hopman TL, Maxwell JA, Nejedly Z. 2000. The Guelph PIXE software package III: alternative proton database. *Nuclear Instrumentas and Methods in Physics Research Section B* 170:193-204.
- Carrano AV, Natarajan AT. 1988. International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens. ICPEMC publication no. 14. Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. *Mutat Res* 204(3):379-406.
- Celik M, Donbak L, Unal F, Yuzbasioglu D, Aksoy H, Yilmaz S. 2007. Cytogenetic damage in workers from a coal-fired power plant. *Mutat Res* 627(2):158-163.
- Chen Y, Shah N, Huggins FE, Huffman GP. 2005. Transmission electron microscopy investigation of ultrafine coal fly ash particles. *Environ Sci Technol* 39(4):1144-1151.
- da Silva J, de Freitas TR, Heuser V, Marinho JR, Erdtmann B. 2000. Genotoxicity biomonitoring in coal regions using wild rodent *Ctenomys torquatus* by Comet assay and micronucleus test. *Environ Mol Mutagen* 35(4):270-278.
- Dallarosa JB, Teixeira EC, Pires M, Fachel J. 2005. Study of the profile of polycyclic aromatic hydrocarbons in atmospheric particles (PM10) using multivariate methods. *Atmospheric Environment* 39(35):10.
- Donbak L, Rencuzogullari E, Yavuz A, Topaktas M. 2005. The genotoxic risk of underground coal miners from Turkey. *Mutat Res* 588(2):82-87.
- He JL, Jin HY, Jin LF, Gao SY. 2000. Monitoring of human exposure to radiation with the binucleated lymphocyte micronucleus assay. *Biomed Environ Sci* 13(1):32-36.
- Hoffmann H, Hogel J, Speit G. 2005. The effect of smoking on DNA effects in the comet assay: a meta-analysis. *Mutagenesis* 20(6):455-466.
- Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, Knasmueller S, Fenech M. 2008. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. *Mutat Res* 659(1-2):93-108.
- Honma HN, De Capitani EM, Perroud MW, Jr., Barbeiro AS, Toro IF, Costa DB, Lima CS, Zambon L. 2008. Influence of p53 codon 72 exon 4, GSTM1, GSTT1 and GSTP1*B polymorphisms in lung cancer risk in a Brazilian population. *Lung Cancer* 61(2):152-162.
- Kumar A, Yadav A, Giri SK, Dev K, Gautam SK, Gupta R, Aggarwal N. 2011. Effect of genetic polymorphism of GSTM1 and GSTT1 genotypes on cytogenetic biomarkers among coaltar workers. *Environ Toxicol Pharmacol* 32(2):128-135.
- Lahiri DK, Nurnberger JI, Jr. 1991. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 19(19):5444.

- Leon-Mejia G, Espitia-Perez L, Hoyos-Giraldo LS, Da Silva J, Hartmann A, Henriques JA, 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(4):686-691.
- Leon G, Perez LE, Linares JC, Hartmann A, Quintana M. 2007. Genotoxic effects in wild rodents (*Rattus rattus* and *Mus musculus*) in an open coal mining area. *Mutat Res* 630(1-2):42-49.
- Mally A, Chipman JK. 2002. Non-genotoxic carcinogens: early effects on gap junctions, cell proliferation and apoptosis in the rat. *Toxicology* 180(3):233-248.
- Pahlich E. 1975. Effect of SO₂-pollution on cellular regulation. A general concept of the mode of action of gaseous air contamination. *Atmos Environ* 9(2):261-263.
- 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(1):169-175.
- Pemble S, Schroeder KR, Spencer SR, Meyer DJ, Hallier E, Bolt HM, Ketterer B, Taylor JB. 1994. Human glutathione S-transferase theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. *Biochem J* 300 (Pt 1):271-276.
- Pindborg JJ, Reibel J, Roed-Peterson B, Mehta FS. 1980. Tobacco-induced changes in oral leukoplakic epithelium. *Cancer* 45(9):2330-2336.
- Rockette HE. 1977. Cause specific mortality of coal miners. *J Occup Med* 19(12):795-801.
- Rohr P, Veit TD, Scheibel I, Xavier RM, Brenol JC, Chies JA, Kvitko K. 2008. GSTT1, GSTM1 and GSTP1 polymorphisms and susceptibility to juvenile idiopathic arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 26(1):151-155.
- Rossi AM, Hansteen IL, Skjelbred CF, Ballardini M, Maggini V, Murgia E, Tomei A, Viarengo P, Knudsen LE, Barale R, Norppa H, Bonassi S. 2009. Association between frequency of chromosomal aberrations and cancer risk is not influenced by genetic polymorphisms in GSTM1 and GSTT1. *Environ Health Perspect* 117(2):203-208.
- Sanchez-Siles M, Ros-Llor I, Camacho-Alonso F, Lopez-Jornet P. 2011. A novel application of the buccal micronucleus cytome assay in oral lichen planus: A pilot study. *Arch Oral Biol*.
- Schins RP. 2002. Mechanisms of genotoxicity of particles and fibers. *Inhal Toxicol* 14(1):57-78.
- Schins RP, Borm PJ. 1999. Mechanisms and mediators in coal dust induced toxicity: a review. *Ann Occup Hyg* 43(1):7-33.
- Schins RP, Schilderman PA, Borm PJ. 1995. Oxidative DNA damage in peripheral blood lymphocytes of coal workers. *Int Arch Occup Environ Health* 67(3):153-157.

- Schoket B, Poirier MC, Mayer G, Torok G, Kolozsi-Ringelhann A, Bognar G, Bigbee WL, Vincze I. 1999. Biomonitoring of human genotoxicity induced by complex occupational exposures. *Mutat Res* 445(2):193-203.
- Shimizu N, Shingaki K, Kaneko-Sasaguri Y, Hashizume T, Kanda T. 2005. When, where and how the bridge breaks: anaphase bridge breakage plays a crucial role in gene amplification and HSR generation. *Exp Cell Res* 302(2):233-243.
- Singh R, Sram RJ, Binkova B, Kalina I, Popov TA, Georgieva T, Garte S, Taioli E, Farmer PB. 2007. The relationship between biomarkers of oxidative DNA damage, polycyclic aromatic hydrocarbon DNA adducts, antioxidant status and genetic susceptibility following exposure to environmental air pollution in humans. *Mutat Res* 620(1-2):83-92.
- Skowronek J, Zemla B. 2003. Epidemiology of lung and larynx cancers in coal mines in Upper Silesia--preliminary results. *Health Phys* 85(3):365-370.
- Sram RJ, Hola N, Kotesovec F, Novakova A. 1985. Cytogenetic analysis of peripheral blood lymphocytes in glass workers occupationally exposed to mineral oils. *Mutat Res* 144(4):277-280.
- Sreeja L, Syamala V, Hariharan S, Syamala VS, Raveendran PB, Sivanandan CD, Madhavan J, Ankathil R. 2008. Glutathione S-transferase M1, T1 and P1 polymorphisms: susceptibility and outcome in lung cancer patients. *J Exp Ther Oncol* 7(1):73-85.
- Swenberg JA. 1993. Cell Proliferation and Chemical Carcinogenesis: summary and future directions. *Environ Health Perspect* 101(Suppl 5):153-158.
- Thomas P, Harvey S, Gruner T, Fenech M. 2008. The buccal cytome and micronucleus frequency is substantially altered in Down's syndrome and normal ageing compared to young healthy controls. *Mutat Res* 638(1-2):37-47.
- Thomas P, Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, Knasmueller S, Fenech M. 2009. Buccal micronucleus cytome assay. *Nat Protoc* 4(6):825-837.
- Une H, Esaki H, Osajima K, Ikui H, Kodama K, Hatada K. 1995. A prospective study on mortality among Japanese coal miners. *Ind Health* 33(2):67-76.
- Wilkinson Jt, Clapper ML. 1997. Detoxication enzymes and chemoprevention. *Proc Soc Exp Biol Med* 216(2):192-200.
- Zhai R, Liu G, Ge X, Yang C, Huang C, Wu C, Christiani DC. 2002. Genetic polymorphisms of MnSOD, GSTM1, GSTT1, and OGG1 in coal workers' pneumoconiosis. *J Occup Environ Med* 44(4):372-377.

Table 1. BMCyt assay results for cells collected from non-exposed and exposed groups (mean \pm standard deviation).

Parameters		Non-Exposed	Exposed
Basal Cells			
	Normal	1.00 \pm 1.31	14.34 \pm 6.73 ^{***}
	MN	0.03 \pm 0.19	0.51 \pm 0.78 ^{***}
Differentiated Cells			
DNA Damage	MN	0.21 \pm 0.41	3.10 \pm 2.22 ^{***}
	Nuclear Buds	6.93 \pm 3.46	7.66 \pm 3.39
	Binucleated Cells	10.79 \pm 3.67	13.26 \pm 4.90 [*]
Cell Death	Condensed Chromatin	11.79 \pm 3.53	5.73 \pm 3.62 ^{***}
	Karyorrhectic Cells	10.00 \pm 2.42	10.80 \pm 4.98
	Pyknotic Cells	8.45 \pm 2.98	8.46 \pm 3.23
	Karyolytic Cells	13.07 \pm 3.00	13.12 \pm 4.45

*Data significant in relation to non-exposed group at $P < 0.05$; *** at $P < 0.001$ (Mann-Whitney - U test)

Table 2. Cross-correlation results between biomarkers of the BMCyt for combined groups

		Basal Cells	MN in Basal Cells	MN in Differentiated Cells	Nuclear Buds	Binucleated Cells	Condensed Chromatin	Karyorrhectic Cells	Pyknotic Cells
MN in Basal Cells	Spearman correlation	0.512							
	Sig.(2-tailed)	0.000							
MN in Differentiated Cells	Spearman correlation	0.722	0.519						
	Sig.(2-tailed)	0.000	0.000						
Nuclear Buds	Spearman correlation	NS	NS	NS					
	Sig.(2-tailed)								
Binucleated Cells	Spearman correlation	0.352	NS	0.327	NS				
	Sig.(2-tailed)	0.003		0.006					
Condensed Chromatin	Spearman correlation	-0.654	-0.302	-0.498	NS	NS			
	Sig.(2-tailed)	0.000	0.011	0.000					
Karyorrhectic Cells	Spearman correlation	0.266	NS	0.331	NS	NS	NS		
	Sig.(2-tailed)	0.026		0.000					
Pyknotic Cells	Spearman correlation	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	
	Sig.(2-tailed)								
Karyolytic Cells	Spearman correlation	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0.188	NS
	Sig.(2-tailed)							0.024	

NS: not significant.

Table 3. Effect of the GSTM1 and GSTT1 genotypes on the exposed group.

Genotypes	Basal Cells		Differentiated Cells						
	Normal	MN	DNA Damage			Cell Death			
			MN	Nuclear Buds	Binucleated Cells	Condensed Chromatin	Karyorrhectic Cells	Pyknotic Cells	Karyolytic Cells
<i>GSTM1</i> non-null	16.52 ± 5.26	0.39 ± 0.72	3.61 ± 1.97	6.17 ± 2.08	14.30 ± 5.99	4.00 ± 1.88	11.00 ± 5.26	7.87 ± 3.04	12.70 ± 5.47
<i>GSTM1</i> null	17.50 ± 3.25	1.00 ± 1.07	2.75 ± 2.25	9.25 ± 3.80 ^a	12.13 ± 3.98	5.75 ± 2.82	11.88 ± 5.77	8.00 ± 3.63	13.25 ± 3.20
<i>GSTT1</i> non-null	16.16 ± 4.29	0.42 ± 0.77	3.26 ± 1.66	7.84 ± 3.70	12.63 ± 4.71	4.95 ± 2.39	10.89 ± 4.52	8.16 ± 2.79	12.53 ± 3.58
<i>GSTT1</i> null	17.36 ± 5.33	0.71 ± 0.91	3.50 ± 2.44	6.29 ± 1.98	15.36 ± 6.17	4.00 ± 1.92	11.93 ± 6.04	8.43 ± 4.22	13.64 ± 6.31

^a Data significant in relation to wild genotype from the same group at P =0.023 - Mann-Whitney U-test).

Table 4. Inorganic element detection by PIXE analyses of blood samples.

Heavy Metal	Non Exposed	Exposed
Magnesium	144.2 ± 76.7	177.7 ± 86.3
Aluminum	110.4 ± 51.7	125.1 ± 37.3
Sulfur	5597 ± 695.9	5206 ± 581.4
Potassium	6462 ± 2920	5910 ± 3286
Iron	2312 ± 504.9	2003 ± 438.3
Copper	4.90 ± 1.81	5.20 ± 1.07
Zinc	40.34 ± 7.0	42.4 ± 9.84

Table 5. Inorganic element detection by PIXE analyses of soil samples.

Heavy Metal	Non Exposed	Exposed
Magnesium	1365 ± 448.1	1623 ± 231.1
Aluminum	42640 ± 4841	69650 ± 2003
Silicon	415000 ± 45950	289600 ± 4083
Phosphorus	155.1 ± 16.26	282.0 ± 203.5***
Sulfur	104.6 ± 18.75	286.8 ± 12.87***
Potassium	12230 ± 1767	7133 ± 585.8
Calcium	1416 ± 139.6	1049 ± 7.78
Titanium	6080 ± 2077	7855 ± 284.5
Chromium	31.68 ± 14.86	57.22 ± 14.73
Manganese	753.4 ± 126.8	616.0 ± 84.31
Iron	15450 ± 2035	51640 ± 6815
Copper	55.07 ± 10.11	72.90 ± 20.07
Zinc	21.40 ± 3.92	49.95 ± 18.05
Zirconium	143.7 ± 61.41	536.0 ± 238.7
Lead	22.77 ± 10.54	61.98 ± 0.12***

*** P<0.0001 in relation to non-exposed group. Mann-Whitney *U*-test.

CAPÍTULO IV

THE INFLUENCE OF BER GENE POLYMORPHISMS (*OGG1 SER326CYS* AND *XRCC1 ARG194TRP*) ON DNA DAMAGE EVALUATED BY THE COMET ASSAY AND THE BUCCAL MICRONUCLEUS CYTOME (BMCYT) ASSAY IN COAL OPEN-CAST MINING WORKERS

Manuscrito a ser submetido à *Mutagenesis*

The influence of BER gene polymorphisms (*OGG1 Ser326Cys* and *XRCC1 Arg194Trp*) on DNA damage evaluated by the comet assay and the buccal micronucleus cytome (BMCyt) assay in coal open-cast mining workers

Paula Rohr^a, Juliana da Silva^{b,*}, Camile Ancines^a, Fernanda R. da Silva^a, Kátia Kvitko^{a,*}

^a Laboratory of Immunogenetics, Postgraduate Programme in Genetics and Molecular Biology (PPGBM), Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre-RS, Brazil

^b Laboratory of Genetic Toxicology, Postgraduate Programme in Genetic Toxicology (PPGGTA), Lutheran University of Brazil (ULBRA), Canoas-RS, Brazil

*Corresponding authors:

Kátia Kvitko, Departamento de Genética e Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Caxias do Sul - RS, Brazil. E-mail: katia.kvitko@ufrgs.br

Juliana da Silva, Universidade Luterana do Brasil, ULBRA, Av. Farroupilha 8001, Prédio 1, Sala 122; 92425-900; Canoas, RS, Brazil. E-mail: juliana.silva@ulbra.br

ABSTRACT

The coal is a largest fossil fuel source used for the generation of energy. During coal extraction large quantities of particles of coal dust are emitted contributing to environmental pollution. Coal residues consists of a mixture of substances, containing carbon, hydrogen, nitrogen, oxygen and sulfur, mineral particles of smaller size and inorganic compounds in the ashes. The coal miners are constantly exposed to coal dust. In recent studies in this area, we found an elevated DNA damage, by Comet Assay parameters, and also the influence of exposition in basal cells, MN in basal and differentiated cells, binucleated cells and condensed chromatin cells in workers. The aim of this study was to evaluate if the two BER polymorphisms (OGG1Ser326Cys: rs1052133 and XRCC1Arg194Trp: rs1799782) could modify individual genotoxic susceptibility to coal exposure in coal miners, as measured by Comet Assay and BMCyt Assays. No differences were observed in Comet Assay parameters between genotypes in exposed and non-exposed groups. In the non-exposed group, individuals whit the XRCC1 Arg/Trp genotype presents lower levels of Karyorrhetic Cells (7.80 ± 0.84) and Pyknotic Cells (3.80 ± 1.92), when compared with individuals XRCC1 Arg/Arg genotype (9.88 ± 2.54 , with $P=0.048$ and 7.86 ± 3.26 , with $P=0.004$, respectively). Therefore, in our study, endpoints of genotoxic insult caused by coal exposure were not influenced by BER gene polymorphisms (OGG1 Ser326Cys and XRCC1 Arg194Trp).

1. INTRODUCTION

Coal is the largest source of fossil fuel used for the generation of energy. During coal extraction, large quantities of coal dust particles are emitted, which contributes to environmental pollution. Coal residue consists of a mixture of substances, including carbon, hydrogen, nitrogen, oxygen and sulfur that occur as smaller mineral particles and inorganic compounds found in the ashes. Therefore, characterizing coal particles and estimating the risks to miners and the environment are of extreme importance (1).

Coal miners are constantly exposed to coal dust, and miners are at an increased risk of developing several diseases due to lung exposure to coal dust, including pneumoconiosis, progressive massive fibrosis, bronchitis, loss of lung function, emphysema and even stomach, liver and lung cancer (2-7). Studies examining coal miners have demonstrated that they have elevated levels of DNA and chromosomal damage, as evaluated through chromosomal aberration, micronucleus (MN) and sister chromatid exchange assays (8-10).

Rio Grande do Sul, a southern state of Brazil, is responsible for 89.25% of the country's coal reserves. In this state, coal extraction is performed in coal open-cast mines. In recent studies of workers in this area, we found elevated damage index and damage frequency (comet assay parameters), and elevated frequencies of basal cells, MN in basal cells, MN in differentiated cells, and binucleated cells (BMCyt parameters) (11-12). In addition, we measured lower frequencies of condensed chromatin cells (BMCyt parameter) in the workers from this area (11).

Some studies have demonstrated the relationship between genetic susceptibility and biomarkers in occupationally exposed populations (13-16). Genetic polymorphisms may influence genotoxic effects and are therefore an important consideration in the evaluation of occupational risk [Norppa, 1997; Iarmarcovai et al., 2008]. The Base Excision Repair (BER) pathway acts on small lesions, such as oxidized and reduced bases, fragmented and non-bulky adducts, or lesions produced by a variety of internal and external factors, such as ionizing radiation, alkylating agents and oxidative stress. The *OGG1* and the *XRCC1* are examples of important proteins in the BER pathway [27-29].

The aim of this study was to determine if the two BER polymorphisms (*OGG1 Ser326Cys*: rs1052133 and *XRCC1 Arg194Trp*: rs1799782) could modify individual genotoxic susceptibility to coal exposure in coal miners, as measured by the comet and BMCyt assays.

2. MATERIALS & METHODS

2.1. Study population and sample collection

This study was approved by the Committee on Research Ethics at UFRGS (N. 2007978), and written informed consent was obtained from each individual before the research began.

Subjects from Candiota and Bagé were sampled from March 2009 to March 2012. A coal mine is located in the city of Candiota, and Bagé is a neighboring city. This study involved a total of 92 individuals, 42 of whom were non-exposed and 50 of whom were occupationally exposed to coal dust. The workers were from the Candiota open-cast coal mine, where they were involved with coal extraction and coal transport up to and including delivery to the storage centers; all of these workers were exposed to large quantities of coal dust. All workers reported using some kind of protection during the workday (gloves, breathing masks, glasses, waterproof boots, etc.). The non-exposed group consisted of individuals from the cities of Candiota and Bagé with no known exposure to genotoxic agents, including coal, radiation, and chemicals.

Buccal cell samples were obtained by gently rubbing the inside of the cheeks (right and left side) with a cytobrush, which was immersed in 5 ml of cold saline (0.9% (w/v) aqueous NaCl) in a conical tube and transported under refrigeration to the laboratory. Blood samples were collected by venipuncture using vacutainers with EDTA or heparin and were processed as quickly as possible, and blood cell samples were transported to the laboratories at or below 8°C and processed (DNA extraction) within 24 h of collection.

All individuals participating in the study were asked to answer a Portuguese-language version of a questionnaire from the International

Commission for Protection against Environmental Mutagens and Carcinogens (17) and to participate in a face-to-face interview, which included standard demographic data (age, gender, etc.), as well as questions concerning medical issues (exposure to X-rays, vaccinations, medication, etc.), lifestyle (smoking, coffee and alcohol consumption, diet, etc.) and occupation (number of working hours per day, protective measures adopted, PPE). In all groups, individuals who smoked more than twenty cigarettes per day were considered smokers (18).

2.2. Comet assay

The alkaline comet assay was performed as described in Singh et al. (1988) (19) with the modifications suggested in Tice et al. (2000) (20). Blood samples (5 μ l) were embedded in 95 μ l of 0.75% low melting point agarose, and after the agarose solidified, slides were placed in lysis buffer (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA and 10 mM Tris; pH 10.0–10.5) containing freshly added 1% (v/v) Triton X-100 and 10% (v/v) dimethyl sulfoxide for a minimum of 1 h and a maximum of 2 weeks. After treatment with lysis buffer, the slides were incubated in freshly prepared alkaline buffer solution (300 mM NaOH and 1 mM EDTA; pH > 13) for 20 min, and DNA was submitted to electrophoresis for 20 min at 25 V (0.90 V/cm) and 300 mA. Following electrophoresis, the buffer solution was neutralized with 0.4 M Tris (pH 7.5) and the DNA was stained with ethidium bromide (2 μ g/ml). The electrophoresis procedure and the efficiency of each of the electrophoresis runs were assessed using negative and positive internal controls consisting of whole human blood collected in the laboratory. The negative control was unmodified blood, and the positive control was 50 μ l blood mixed with 13 μ l (8×10^{-5} M) methyl methanesulfonate (CAS 66-27-3; Sigma, St Louis, MO, USA) and incubated for 2 h at 37°C. Each electrophoresis run was considered valid only if the negative and positive controls yielded the expected results. Slides were randomized and coded for analysis by a blinded scorer. Images of 100 randomly selected cells (50 cells from each of two replicate slides) were analyzed for each individual using a fluorescence microscope equipped with a 12-nm BP546 excitation filter and a 590-nm barrier filter. Two parameters were evaluated: (i)

damage index, in which each cell was assigned to one of five classes (from no damage = 0 to maximum damage = 4) according to tail size and shape (see figures in Heuser *et al.*, 2007) and whose values obtained for each of the individuals ranged from 0 (0 × 100) to 400 (4 × 100), with the damage frequency (DF) calculated as the percentage of damaged cells. International guidelines and recommendations for the comet assay consider that the visual scoring of comets is a well-validated evaluation method. Although the DI parameter is subjective, it is highly correlated with computer-based image analysis (20-21).

2.3. Buccal micronucleus cytome assay (BMCyt assay)

The saline was centrifuged at 1500 rpm for 8 min, and then the sedimented buccal cells were washed twice with saline and once with Carnoy's fixative (methanol and glacial acetic acid 3:1) under the same centrifugation conditions. The cell suspension was dropped onto a slide and allowed to air-dry. The slides were stained with 2% Giemsa solution for 10 min, rinsed in distilled water and air-dried. For each individual, the frequency of the various cell types in the assay was represented as the number of cells in 2,000, as suggested by Thomas *et al.* (2009) (22).

2.4. Genotyping

Genomic DNA was isolated from whole blood by the salting out method (23).

2.4.1. OGG1 Ser326Cys Polymorphism

The *OGG1 Ser326Cys* polymorphism (rs#1052134) was genotyped using the primers and PCR conditions indicated by De Ruyck *et al.* (2005) (24). An aliquot of the PCR product was digested with the AlwI enzyme, and the genotypes were resolved using a 3% agarose gel stained with ethidium bromide.

2.4.2. XRCC1Arg194Trp Polymorphism

The *XRCC1 Arg194Trp* polymorphism (rs#1799782) was genotyped by PCR/RFLP according to the protocol of Lunn et al. (1999) (25). The *XRCC1 194Arg* and *XRCC1 194Trp* alleles were detected after digestion with the PvuII enzyme, and the genotypes were resolved using a 3% agarose gel stained with ethidium bromide.

2.5. Statistical analysis

The normality of variables was evaluated by the Kolmogorov–Smirnov test. The statistical analysis of differences in parameters measured by the BMCyt assay was carried out using Mann–Whitney U non-parametric test. Correlations between different variables were determined by Spearman rank correlation test when applicable. Effect of GSTs genotypes in exposed groups were investigated using Mann–Whitney U non-parametric test. The critical level for rejection of the null hypothesis was considered to be a P value of 5%, two tailed. The analyses were performed with the GraphPad Prism version 5.00 for Windows.

3. RESULTS

No significant differences in age were detected between the non-exposed (42.08 ± 15.12) and exposed groups (43.79 ± 7.94) (t-test). The mean exposure time for the exposed group was 13.38 ± 8.66 years (time of experience in coal mining). No smokers were included in these groups.

Considering the exposed and non-exposed groups as unique groups, the allelic frequencies for *OGG1 326Cys* and *XRCC1 194Trp* were 0.375 and 0.040, respectively (data not shown). Table 1 demonstrates the effect of individual genotypes on parameters evaluated by the comet assay in the exposed and non-exposed groups. No differences were observed in these parameters between genotypes in the exposed and non-exposed groups.

Table 2 demonstrates the effect of individual genotypes on the parameters evaluated by the BMCyt assay in the exposed and non-exposed groups. In the non-exposed groups, individuals with the *XRCC1* Arg/Trp genotype had lower levels of karyorrhectic (7.80 ± 0.84) and pyknotic cells (3.80 ± 1.92) when compared with individuals with the *XRCC1* Arg/Arg genotype (9.88 ± 2.54 , with $P=0.048$, and 7.86 ± 3.26 , with $P=0.004$, respectively).

4. DISCUSSION

Human biomonitoring is used in the identification of the early biological effects of DNA-damaging agents in occupational settings. In recent years, the Comet assay has been proven to be a very sensitive method for investigating levels of DNA damage and a useful tool for the detection of genetic damage at the individual cell level and in human biomonitoring (21,26). This assay has been widely used to detect strand breaks, alkali-labile sites, DNA crosslinking and incomplete excision repair sites (21,26-27). The BMCyt assay is being increasingly used, and, in last decade, the number of publications utilizing this method has been higher (28). Three variety of complementary toxicological endpoints evaluated, as a biomarker of chromosome breakage or loss, gene amplification, cytokinesis-failure or arrest, and various forms of cell death measured (22).

The individual response to stress may vary according to various conditions, such as the functioning of the particular gene combination, the metabolism rate of genotoxic agents and DNA repair, among others (29). The various types of DNA damage are repaired through multiple pathways, among which the base excision repair (BER) is the major pathway for removing damaged bases and DNA single strand breaks (SSB) from DNA in human cells. This pathway is a multi-step process which involves several proteins, and the genes encoding for these proteins have been proposed as potential cancer susceptibility genes (30). In order to evaluate if genetically-determined individual variations of DNA repair enzymes from BER pathway polymorphism could modify individual susceptibility to coal exposure, we genotyped occupationally exposed subjects from for *OGG1* Ser326Cys and *XRCC1* Arg(R)194Trp(W).

The OGG1 protein acts in the first step of BER, catalyzing the excision of oxidized purines, including 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxoG) and ring-opened purines (31). Reduced ability to remove 8-oxoG can lead to increased mutation induction. Studies on the effect of the *OGG1 Ser326Cys* substitution in several populations revealed that the Cys allele has a lower repair activity than the wild type allele (32-33). Evidence suggests that this is due to reduced repair ability, particularly under oxidising conditions but the underlying mechanism is poorly understood (34). Despite our results did not show significant difference between *OGG1* genotypes on the Comet Assay and BMCyt parameters, exposed individuals with variant allele (*OGG1 Cys*) showed a higher DNA damage detected by the Comet assay in relation to individuals carrying the wild-type *OGG1 Ser* allele. In a previous study, we found similar results, with a sample of pesticides exposed individuals (35). The observed DNA strand breaks could reflect the intermediates of delayed BER as a result of the lower enzyme activity. These results are in agreement with other studies suggesting that the *OGG1 Cys* allele could have lower ability to suppress mutation and it could be considered as risk factor for development of different kind of cancer (32-33,36-37).

In relation to coal exposition, few studies were conducted. In a population with extremely high PAH exposure due to the use of smoky coal, the *OGG1Cys* allele lead to increased risk for lung cancer development, odds ratio of 1.9 (95%CI=1.1–3.3), in Lan *et al.* (2004) (38). Zhai *et al.* (2002) (39) did not associate the *OGG1 Ser326Cys* polymorphism with the pneumoconiosis development, in coal miners.

The *XRCC1* polymorphism has no effect on the Comet Assay and BMCyt parameters in exposed group. The *XRCC1* protein plays an important role in the BER pathway, acting as a scaffold to coordinate other BER proteins, like DNA polymerase β , DNA ligase III and poly-ADP-ribose polymerase (PARP) (40). The *XRCC1Arg194Trp* polymorphism, which occurs in the proliferating cell nuclear antigen-binding region, has been suggested to enhance the individual DNA repair capacity (reviewed in Frosina, 2004 (40)). In the exposed individuals, the *XRCC1* genotype did not show influence on BMCyt endpoints. Whereas, in non-exposed

group, the variant *XRCC1* genotype (*XRCC1Arg/Trp*) showed a protector effect on number of Karyorrhetic and Pyknotic Cells, biomarkers of death cell.

The BER mechanism, can lead to single-strand breaks (SSBs) that could represent a serious risk for cells if they are not filled by a polymerase and rejoined by DNA ligase. In fact during DNA replication SSBs could be converted to more lethal DNA double-strand breaks, and this could generate deletions, chromosome translocations, hence genomic instability and in some circumstances induce cell cycle arrest and apoptosis (41).

Studies demonstrated that environmental exposure may down-regulate expression of some DNA repair genes, including *XRCC1*. Breton *et al.* (2007) (42) suggest that this regulation may be allele specific and the wild-type genotype is more effectively down-regulated than the *XRCC1* heterozygote or homozygous variants. Thus, the variant genotype would be protective against DNA strand breaks accumulation, since the DNA repair would be inhibited more effectively in individuals with the wild-type genotype. The protection effect of the variant allele *XRCC1 Trp* has been observed against cancer, such as bladder, breast, lung and stomach cancer; however, inverse association was detected in studies of squamous cell carcinoma of head and neck (SCCHN), chronic gastritis, gastric and lung cancer (30,42-48).

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 BER gene polymorphisms (*OGG1 Ser326Cys* and *XRCC1 Arg194Trp*). In this context, larger sample sizes may increase sensitivity of data in further studies, consolidating statistical power in the stratification of the statistical analysis. 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.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

This work was financially supported by the Brazilian agencies Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

6. REFERENCES

1. Chen, Y., Shah, N., Huggins, F.E., and Huffman, G.P. (2005) Transmission electron microscopy investigation of ultrafine coal fly ash particles. *Environ Sci Technol*, **39**, 1144-1151.
2. Beckman, K.B., and Ames, B.N. (1997) Oxidative decay of DNA. *J Biol Chem*, **272**, 19633-19636.
3. Rockette, H.E. (1977) Cause specific mortality of coal miners. *J Occup Med*, **19**, 795-801.
4. Schins, R.P., and Borm, P.J. (1999) Mechanisms and mediators in coal dust induced toxicity: a review. *Ann Occup Hyg*, **43**, 7-33.
5. Schins, R.P., Schilderman, P.A., and Borm, P.J. (1995) Oxidative DNA damage in peripheral blood lymphocytes of coal workers. *Int Arch Occup Environ Health*, **67**, 153-157.
6. Skowronek, J., and Zemla, B. (2003) Epidemiology of lung and larynx cancers in coal mines in Upper Silesia--preliminary results. *Health Phys*, **85**, 365-370.
7. Une, H., Esaki, H., Osajima, K., Ikui, H., Kodama, K., and Hatada, K. (1995) A prospective study on mortality among Japanese coal miners. *Ind Health*, **33**, 67-76.
8. Donbak, L., Rencuzogullari, E., Yavuz, A., and Topaktas, M. (2005) The genotoxic risk of underground coal miners from Turkey. *Mutat Res*, **588**, 82-87.
9. Sram, R.J., Hola, N., Kotesovec, F., and Novakova, A. (1985) Cytogenetic analysis of peripheral blood lymphocytes in glass workers occupationally exposed to mineral oils. *Mutat Res*, **144**, 277-280.
10. Leon-Mejia, G., Espitia-Perez, L., Hoyos-Giraldo, L.S., Da Silva, J., Hartmann, A., Henriques, J.A., and 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.
11. Rohr, P., da Silva, J., da Silva, F.R., Sarmiento, M., Porto, C., Ancines, C., and Kvitko, K. (2012) Evaluation of genetic damage in coal open-cast mining workers using buccal micronucleus cytome assay and its correlation with GSTM1 and GSTT1 polymorphisms. *In preparation*.

12. Rohr, P., Kvitko, K., da Silva, F.R., Decker, N., Leão, G., and da Silva, J. (2012) Assessment occupational risk of coal open-cast mining workers DNA damage in coal open-cast mining workers. *In preparation*.
13. Pitarque, M., Vaglenov, A., Nosko, M., Hirvonen, A., Norppa, H., Creus, A., and Marcos, R. (1999) Evaluation of DNA damage by the Comet assay in shoe workers exposed to toluene and other organic solvents. *Mutat Res*, **441**, 115-127.
14. Pitarque, M., Vaglenov, A., Nosko, M., Pavlova, S., Petkova, V., Hirvonen, A., Creus, A., Norppa, H., and Marcos, R. (2002) Sister chromatid exchanges and micronuclei in peripheral lymphocytes of shoe factory workers exposed to solvents. *Environ Health Perspect*, **110**, 399-404.
15. Hernandez, A.F., Lopez, O., Rodrigo, L., Gil, F., Pena, G., Serrano, J.L., Parron, T., Alvarez, J.C., Lorente, J.A., and Pla, A. (2005) Changes in erythrocyte enzymes in humans long-term exposed to pesticides: influence of several markers of individual susceptibility. *Toxicol Lett*, **159**, 13-21.
16. Heuser, V.D., Erdtmann, B., Kvitko, K., Rohr, P., and da Silva, J. (2007) Evaluation of genetic damage in Brazilian footwear-workers: biomarkers of exposure, effect, and susceptibility. *Toxicology*, **232**, 235-247.
17. Carrano, A.V., and Natarajan, A.T. (1988) International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens. ICPEMC publication no. 14. Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. *Mutat Res*, **204**, 379-406.
18. Hoffmann, H., Hogel, J., and Speit, G. (2005) The effect of smoking on DNA effects in the comet assay: a meta-analysis. *Mutagenesis*, **20**, 455-466.
19. Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., and Schneider, E.L. (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*, **175**, 184-191.
20. Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., and 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.
21. Collins, A.R. (2004) The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol*, **26**, 249-261.
22. Thomas, P., Holland, N., Bolognesi, C., Kirsch-Volders, M., Bonassi, S., Zeiger, E., Knasmueller, S., and Fenech, M. (2009) Buccal micronucleus cytome assay. *Nat Protoc*, **4**, 825-837.
23. Lahiri, D.K., and Nurnberger, J.I., Jr. (1991) A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res*, **19**, 5444.
24. De Ruyck, K., Van Eijkeren, M., Claes, K., Morthier, R., De Paepe, A., Vral, A., De Ridder, L., and Thierens, H. (2005) Radiation-induced damage to normal tissues after radiotherapy in patients treated for gynecologic tumors: association with single nucleotide polymorphisms in XRCC1, XRCC3, and

- OGG1 genes and in vitro chromosomal radiosensitivity in lymphocytes. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, **62**, 1140-1149.
25. Lunn, R.M., Langlois, R.G., Hsieh, L.L., Thompson, C.L., and Bell, D.A. (1999) XRCC1 polymorphisms: effects on aflatoxin B1-DNA adducts and glycophorin A variant frequency. *Cancer Res*, **59**, 2557-2561.
 26. Dusinska, M., and Collins, A.R. (2008) The comet assay in human biomonitoring: gene-environment interactions. *Mutagenesis*, **23**, 191-205.
 27. Fairbairn, D.W., Olive, P.L., and O'Neill, K.L. (1995) The comet assay: a comprehensive review. *Mutat Res*, **339**, 37-59.
 28. Holland, N., Bolognesi, C., Kirsch-Volders, M., Bonassi, S., Zeiger, E., Knasmueller, S., and Fenech, M. (2008) The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. *Mutat Res*, **659**, 93-108.
 29. Norppa, H. (1997) Cytogenetic markers of susceptibility: influence of polymorphic carcinogen-metabolizing enzymes. *Environ Health Perspect*, **105 Suppl 4**, 829-835.
 30. Hung, R.J., Hall, J., Brennan, P., and Boffetta, P. (2005) Genetic polymorphisms in the base excision repair pathway and cancer risk: a HuGE review. *Am J Epidemiol*, **162**, 925-942.
 31. Dizdaroglu, M. (2005) Base-excision repair of oxidative DNA damage by DNA glycosylases. *Mutat Res*, **591**, 45-59.
 32. Ito, H., Hamajima, N., Takezaki, T., Matsuo, K., Tajima, K., Hatooka, S., Mitsudomi, T., Suyama, M., Sato, S., and Ueda, R. (2002) A limited association of OGG1 Ser326Cys polymorphism for adenocarcinoma of the lung. *J Epidemiol*, **12**, 258-265.
 33. Yamane, A., Kohno, T., Ito, K., Sunaga, N., Aoki, K., Yoshimura, K., Murakami, H., Nojima, Y., and 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.
 34. Kershaw, R.M., and Hodges, N.J. (2012) Repair of oxidative DNA damage is delayed in the Ser326Cys polymorphic variant of the base excision repair protein OGG1. *Mutagenesis*.
 35. Rohr, P., da Silva, J., Erdtmann, B., Saffi, J., Guecheva, T.N., Antonio Pegas Henriques, J., and Kvitko, K. (2011) BER gene polymorphisms (OGG1 Ser326Cys and XRCC1 Arg194Trp) and modulation of DNA damage due to pesticides exposure. *Environ Mol Mutagen*, **52**, 20-27.
 36. Kohno, T., Shinmura, K., Tosaka, M., Tani, M., Kim, S.R., Sugimura, H., Nohmi, T., Kasai, H., and Yokota, J. (1998) Genetic polymorphisms and alternative splicing of the hOGG1 gene, that is involved in the repair of 8-hydroxyguanine in damaged DNA. *Oncogene*, **16**, 3219-3225.
 37. Takezaki, T., Gao, C.M., Wu, J.Z., Li, Z.Y., Wang, J.D., Ding, J.H., Liu, Y.T., Hu, X., Xu, T.L., Tajima, K., and Sugimura, H. (2002) hOGG1 Ser(326)Cys

- polymorphism and modification by environmental factors of stomach cancer risk in Chinese. *Int J Cancer*, **99**, 624-627.
38. Lan, Q., Mumford, J.L., Shen, M., Demarini, D.M., Bonner, M.R., He, X., Yeager, M., Welch, R., Chanock, S., Tian, L., Chapman, R.S., Zheng, T., Keohavong, P., Caporaso, N., and Rothman, N. (2004) Oxidative damage-related genes AKR1C3 and OGG1 modulate risks for lung cancer due to exposure to PAH-rich coal combustion emissions. *Carcinogenesis*, **25**, 2177-2181.
 39. Zhai, R., Liu, G., Ge, X., Yang, C., Huang, C., Wu, C., and Christiani, D.C. (2002) Genetic polymorphisms of MnSOD, GSTM1, GSTT1, and OGG1 in coal workers' pneumoconiosis. *J Occup Environ Med*, **44**, 372-377.
 40. Frosina, G. (2004) Commentary: DNA base excision repair defects in human pathologies. *Free Radic Res*, **38**, 1037-1054.
 41. Sterpone, S., and Cozzi, R. (2010) Influence of XRCC1 Genetic Polymorphisms on Ionizing Radiation-Induced DNA Damage and Repair. *J Nucleic Acids*, **2010**.
 42. Breton, C.V., Zhou, W., Kile, M.L., Houseman, E.A., Quamruzzaman, Q., Rahman, M., Mahiuddin, G., and Christiani, D.C. (2007) Susceptibility to arsenic-induced skin lesions from polymorphisms in base excision repair genes. *Carcinogenesis*, **28**, 1520-1525.
 43. Duarte, M.C., Colombo, J., Rossit, A.R., Caetano, A., Borim, A.A., Wornath, D., and Silva, A.E. (2005) Polymorphisms of DNA repair genes XRCC1 and XRCC3, interaction with environmental exposure and risk of chronic gastritis and gastric cancer. *World J Gastroenterol*, **11**, 6593-6600.
 44. Goode, E.L., Ulrich, C.M., and Potter, J.D. (2002) Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **11**, 1513-1530.
 45. Hu, Z., Ma, H., Chen, F., Wei, Q., and Shen, H. (2005) XRCC1 polymorphisms and cancer risk: a meta-analysis of 38 case-control studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **14**, 1810-1818.
 46. Shen, H., Xu, Y., Qian, Y., Yu, R., Qin, Y., Zhou, L., Wang, X., Spitz, M.R., and Wei, Q. (2000) Polymorphisms of the DNA repair gene XRCC1 and risk of gastric cancer in a Chinese population. *Int J Cancer*, **88**, 601-606.
 47. Stern, M.C., Umbach, D.M., van Gils, C.H., Lunn, R.M., and Taylor, J.A. (2001) DNA repair gene XRCC1 polymorphisms, smoking, and bladder cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **10**, 125-131.
 48. Sturgis, E.M., Castillo, E.J., Li, L., Zheng, R., Eicher, S.A., Clayman, G.L., Strom, S.S., Spitz, M.R., and Wei, Q. (1999) Polymorphisms of DNA repair gene XRCC1 in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Carcinogenesis*, **20**, 2125-2129.

Table 1. Effect of the OGG1 and XRCC1 genotypes on parameters evaluated using the comet assay in the non-exposed and exposed groups (mean \pm S.D.). P value from Mann Whitney U-test.

Parameter	Repair Genotypes	Non-Exposed	Exposed
Damage Index	<i>OGG1</i> Ser/Ser	15.67 \pm 9.36	16.08 \pm 7.96
	<i>OGG1</i> Cys/ -	14.95 \pm 8.58	20.78 \pm 11.99
	P	0.749	0.173
	<i>XRCC1</i> Arg/Arg	15.06 \pm 9.11	17.95 \pm 9.94
	<i>XRCC1</i> Arg/Trp	14.75 \pm 4.65	11.67 \pm 3.51
	P	0.911	0.322
Damage Frequency	<i>OGG1</i> Ser/Ser	12.28 \pm 6.54	13.42 \pm 5.75
	<i>OGG1</i> Cys/ -	12.00 \pm 5.98	15.56 \pm 8.75
	P	0.922	0.402
	<i>XRCC1</i> Arg/Arg	12.00 \pm 6.39	14.09 \pm 7.14
	<i>XRCC1</i> Arg/Trp	12.50 \pm 6.12	11.00 \pm 3.00
	P	0.584	0.442

Table 2. Effect of the OGG1 and XRCC1 genotypes on parameters evaluated using the BMCyt assay in the non-exposed and exposed groups (mean \pm S.D.). In bold significant results (Mann Whitney U-test).

Parameter	Repair Genotypes	Non-Exposed	Exposed
Basal Cells	<i>OGG1</i> Ser/Ser	1.22 \pm 1.80	14.95 \pm 6.79
	<i>OGG1</i> Cys/ -	0.90 \pm 1.22	14.23 \pm 7.07
	P	0.670	0.775
	<i>XRCC1</i> Arg/Arg	1.26 \pm 1.51	14.18 \pm 6.59
	<i>XRCC1</i> Arg/Trp	0.20 \pm 0.45	18.67 \pm 1.15
	P	0.079	0.202
MN in basal Cells	<i>OGG1</i> Ser/Ser	0.06 \pm 0.24	0.27 \pm 0.46
	<i>OGG1</i> Cys/ -	0.00 \pm 0.00	0.85 \pm 1.07
	P	0.189	0.139
	<i>XRCC1</i> Arg/Arg	0.02 \pm 0.15	0.41 \pm 0.66
	<i>XRCC1</i> Arg/Trp	0.00 \pm 0.00	1.00 \pm 1.00
	P	0.948	0.268
MN in Differentiated Cells	<i>OGG1</i> Ser/Ser	0.22 \pm 0.43	2.91 \pm 1.97
	<i>OGG1</i> Cys/ -	0.19 \pm 0.40	2.85 \pm 2.30
	P	0.812	0.906
	<i>XRCC1</i> Arg/Arg	0.19 \pm 0.39	2.91 \pm 2.04
	<i>XRCC1</i> Arg/Trp	0.00 \pm 0.00	5.00 \pm 3.61
	P	0.511	0.245
Buds in Differentiated Cells	<i>OGG1</i> Ser/Ser	9.17 \pm 4.41	7.32 \pm 2.78
	<i>OGG1</i> Cys/ -	8.42 \pm 3.64	7.77 \pm 4.34
	P	0.520	0.827
	<i>XRCC1</i> Arg/Arg	8.70 \pm 4.21	7.56 \pm 3.38
	<i>XRCC1</i> Arg/Trp	9.60 \pm 1.67	7.76 \pm 1.16
	P	0.449	0.542

Binucleated Cells	<i>OGG1</i> Ser/Ser	12.44 ± 4.87	14.36 ± 6.00
	<i>OGG1</i> Cys/ -	11.52 ± 3.19	14.00 ± 5.92
	P	0.360	0.699
	<i>XRCC1</i> Arg/Arg	12.05 ± 3.60	14.09 ± 6.05
	<i>XRCC1</i> Arg/Trp	9.60 ± 4.72	11.33 ± 2.89
	P	0.232	0.472
Condensed Chromatin	<i>OGG1</i> Ser/Ser	12.61 ± 3.18	5.05 ± 3.61
	<i>OGG1</i> Cys/ -	12.00 ± 2.60	6.23 ± 2.98
	P	0.470	0.130
	<i>XRCC1</i> Arg/Arg	12.60 ± 3.06	5.71 ± 3.79
	<i>XRCC1</i> Arg/Trp	10.60 ± 2.88	5.00 ± 3.46
	P	0.183	0.654
Karyorrhectic Cells	<i>OGG1</i> Ser/Ser	9.88 ± 2.54	10.71 ± 5.35
	<i>OGG1</i> Cys/ -	7.80 ± 0.84	10.67 ± 1.16
	P	0.180	0.169
	<i>XRCC1</i> Arg/Arg	9.88 ± 2.54	10.71 ± 5.35
	<i>XRCC1</i> Arg/Trp	7.80 ± 0.84	10.67 ± 1.15
	P	0.048	0.855
Pyknotic Cells	<i>OGG1</i> Ser/Ser	7.86 ± 3.26	8.59 ± 3.39
	<i>OGG1</i> Cys/ -	3.80 ± 1.92	8.00 ± 2.65
	P	0.609	0.448
	<i>XRCC1</i> Arg/Arg	7.86 ± 3.26	8.59 ± 3.39
	<i>XRCC1</i> Arg/Trp	3.80 ± 1.92	8.00 ± 2.65
	P	0.004	0.896
Karyolytic Cells	<i>OGG1</i> Ser/Ser	13.28 ± 2.59	12.97 ± 4.69
	<i>OGG1</i> Cys/ -	11.20 ± 4.66	15.00 ± 4.58
	P	0.942	0.371
	<i>XRCC1</i> Arg/Arg	13.28 ± 2.59	12.97 ± 4.69
	<i>XRCC1</i> Arg/Trp	11.20 ± 4.66	15.00 ± 4.58
	P	0.219	0.439

CAPÍTULO V

DISCUSSÃO

1. DISCUSSÃO

Nos últimos tempos, o interesse no desenvolvimento de técnicas que tornem possível o biomonitoramento de indivíduos expostos cronicamente a poluentes tem aumentado consideravelmente. Estudos mostram que trabalhadores de diversos ramos de produção apresentam maiores chance de enfermidades recorrentes, devido à exposição a substâncias genotóxicas específicas de cada setor, por isso chamada de exposição ocupacional (De Celis *et al.*, 2005; Fritschi *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2010; Richiardi *et al.*, 2006). A *National Occupational Research Agenda* (NORA) avaliou a exposição ocupacional, de uma maneira geral, como responsável por pelo menos 4% dos casos de câncer em humanos (Ward *et al.*, 2003). Estudos de risco ocupacional reprodutivo têm demonstrado aumento nas taxas de aborto espontâneo em mulheres que trabalham com químicos em hospitais e laboratórios. Estima-se que mais de 50% das mortes fetais, 30% dos casos de retardo mental, 20% dos casos de defeitos congênitos, além de 2% dos problemas relacionados com infertilidade masculina estejam associados a aberrações cromossômicas em células germinativas (Keshava & Ong, 1999; Thulstrup & Bonde, 2006; Vaktskjold *et al.*, 2011). Tais dados mostram a importância do biomonitoramento dos trabalhadores, de diversos setores de produção, expostos a substâncias reconhecidamente ou potencialmente de riscos à saúde dos mesmos.

Sabe-se que a mineração do carvão é uma atividade com grande capacidade de poluir (Zahrzewski, 1991), uma vez que durante o processo de extração e combustão muitas substâncias são liberadas no ambiente (White, 2002). O carvão no Rio Grande do Sul (RS) representa aproximadamente 90% das reservas do Brasil. O carvão deste Estado é tipicamente obtido por mineração a céu-aberto, sendo de baixa qualidade, com teores de enxofre variando de 1-5% e elevados teores de cinzas. Além disto, ele é basicamente utilizado para geração elétrica na usina localizada no município de Candiota, RS. Esta região contribui com 38% da produção nacional de carvão, desta forma uma grande quantidade de carvão e de seus derivados são adicionados à atmosfera, água e solo.

O carvão é uma mistura complexa de diferentes substâncias químicas, especialmente hidrocarbonetos, os quais podem dar origem aos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP). Muitos destes HAP apresentam efeitos de mutagenicidade e carcinogenicidade, sendo que alguns destes são encontrados no carvão do RS, tais como: benz(a)antraceno, criseno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno e benzo(g,h,i)perileno (Dallarosa *et al.*, 2005). Além dos hidrocarbonetos, o carvão contém altas concentrações de diversos metais, entre os quais podemos citar: cobre, chumbo, cádmio, níquel, vanádio e zinco (Hopkins *et al.*, 1999; McDaniel *et al.*, 2005; Moriske *et al.*, 1996). Embora existam evidências insuficientes em relação à carcinogenicidade provocada por alguns destes metais em humanos, eles tanto sozinhos como em efeito sinérgico com outros agentes, como os HPA, pertencem a uma classe de poluentes descritos como genotóxicos (Cherng *et al.*, 1996; da Silva *et al.*, 2000a; Sutou, 1996).

No Brasil, alguns estudos quanto à exposição ao carvão demonstraram o efeito genotóxico em diferentes espécies, como roedores silvestres, morcegos e lesmas terrestres (da Silva *et al.*, 2000a; da Silva *et al.*, 2000b; Leffa *et al.*, 2010). O Ministério da Saúde reconhece a exposição ao carvão mineral, como um fator de risco para diversas doenças que atingem diferentes órgãos e sistemas. Entre as que atingem o trato respiratório podemos citar asma obstrutiva, bronquites crônica e obstrutiva e pneumoconiose, além de problemas de pele, como dermatites alérgicas de contato (Saúde, 1999). Até o presente momento o efeito genotóxico do carvão não foi avaliado, em seres humanos.

Os resultados obtidos em nosso estudo referente aos trabalhadores de minas de carvão de Candiota em comparação aos não expostos demonstraram tanto efeito genotóxico como mutagênico, pelo Ensaio Cometa e Teste de MN, respectivamente, sendo que este último avaliado tanto em linfócitos binucleados e como em mucosa oral (BMCyt) (Capítulos II e III).

Aumento do dano ao DNA analisado pelos parâmetros do Ensaio Cometa (índice e frequência de danos) e do Teste MN em linfócitos (micronúcleos e pontes citoplasmática) foi observado, nos indivíduos expostos ao carvão mineral (Capítulo II). Os dados de Ensaio Cometa alcalino referente aos tipos de danos mostraram as classes 1 e 2 como as mais frequentes. A ação do agente genotóxico reflete em quebras simples e dupla do DNA, dano oxidativo, *crosslinks* com DNA e indução de apoptose, estas observadas no Ensaio Cometa (Dusinska & Collins, 2008). Enquanto que o teste de bloqueio da citocinese, o Testes de MN, é um sistema completo de mensuração de danos ao DNA (Fenech, 2007). Onde, eventos de danos ao DNA são avaliados especificamente em células binucleadas e incluem observação de MN, os quais tem origem a partir de fragmentos de cromossomos ou cromossomos inteiros que se atrasam na anáfase durante a divisão nuclear; outros parâmetros observados são pontes citoplasmáticas, que é um biomarcador de erro no reparo de DNA e/ou fusões finais dos telômeros, além de brotos celulares (Buds), um biomarcador da eliminação de DNA amplificado e/ou do complexo de reparo agindo (Fenech, 2007).

Outros estudos já haviam observado aumento de dano em trabalhadores de minas de carvão de outras localidades. Léon *et al* (2011) observaram o aumento dos diferentes parâmetros do Ensaio Cometa e no número de MN em linfócitos binucleados de trabalhadores de minas de carvão a céu aberto, da região de Guajira, na Colômbia. Outros estudos, com trabalhadores de minas subterrâneas observaram aumento do índice de aberrações cromossômicas e troca de cromátides irmãs (Donbak *et al.*, 2005; Sram *et al.*, 1985). Corroborando estes resultados, observamos maior número de micronúcleos em células de mucosa oral (Capítulo III). Nosso trabalho foi o primeiro a analisar todos os parâmetros possíveis do BMCyt em indivíduos expostos ao carvão. Anteriormente, o efeito da exposição ao carvão só tinha sido avaliado em células de mucosa oral por Kumar *et al.* (2011), que analisaram apenas a frequência de MN em células diferenciadas, e os indivíduos expostos ao carvão apresentaram um aumento significativo em relação aos indivíduos não expostos (Kumar *et al.*, 2011).

Nos trabalhadores de minas de carvão de Candiota, o BMCyt foi capaz de verificar, além do aumento de dano ao DNA, ao apresentar maior frequência de MN em células basais e também em células diferenciadas, um aumento no potencial regenerativo, verificado através do aumento do número de células basais, bem como falhas na citocinese, observadas a partir do aumento de células binucleadas (Capítulo III).

Micronúcleos em células de mucosa oral, da mesma forma que em linfócitos, são formados a partir de fragmentos e de cromossomo inteiros, que permanecem excluídos do núcleo principal após a mitose (Holland *et al.*, 2008), assim, podendo indicar um risco aumentado para o desenvolvimento de câncer (He *et al.*, 2000). Células bucais estão em contato constante com o ambiente, o que sugere que o epitélio oral é um importante alvo para tóxicos inalados, sendo assim, é razoável esperar, em virtude da exposição crônica à poeira de carvão, que a mucosa oral de trabalhadores de minas de carvão apresente sinais de maior genotoxicidade (maior frequência de micronúcleos em células diferenciadas e basais) em relação aos grupo de indivíduos não expostos.

Células binucleadas também foram encontradas em maior frequência no grupo exposto. O significado preciso destas células não está bem esclarecido, mas pode ser indicativo de falha na citocinese na última divisão nuclear. Como já mostrado em estudo envolvendo o ensaio BMCyt na Síndrome de Down (Thomas *et al.*, 2008), a relação de células binucleadas/mononucleadas pode ser um importante biomarcador para a identificação de indivíduos com insuficiência citocinese causados por aneuploidia. Alteração no número de cromossomos destaca-se como um marcador consistente de malignidade (Sanchez-Siles *et al.*, 2011).

A proporção de células basais nas células epiteliais é um indicativo da capacidade de regeneração deste tecido (Thomas *et al.*, 2009). No nosso estudo, o grupo exposto mostrou maior frequência das células basais em comparação ao grupo não exposto. Tem sido demonstrado que a exposição crônica a citotoxinas pode resultar em lesão crônica das células, levando a uma proliferação celular compensatória, que indica a capacidade de regeneração, como também, na

hiperplasia, e por consequência podendo resultar no desenvolvimento de tumor (Mally & Chipman, 2002; Swenberg, 1993).

Diferente do que era esperado, na avaliação de morte celular, o grupo não exposto foi onde encontramos maior frequência de células com cromatina condensada em relação ao grupo exposto. O aumento da frequências de células com cromatina condensada pode ocorrer no processo de pré-queratinização (Pindborg *et al.*, 1980), representando a citotoxicidade (Thomas *et al.*, 2008). Assim, acredita-se que este tipo de células aumentou em indivíduos não expostos deve ter ocorrido ao acaso.

Os resultados de correlação sugerem uma relação positiva e significativa de células basais com células binucleadas, cariorréticas, cariólíticas e células com micronúcleos (Capítulo III). A correlação positiva entre células basais e células cariorréticas sugere que as últimas possam ser derivadas diretamente de células basais, como descrito anteriormente por Thomas *et al.* (2008).

Podemos salientar que a técnica BMCyt é uma importante metodologia a ser empregada na avaliação dos potenciais riscos da exposição ocupacional a substâncias. Uma vez que este teste é pouco invasivo e de baixo custo, capaz de avaliar o dano ao DNA, a instabilidade cromossômica, a morte celular, como também o potencial regenerativo (Thomas *et al.*, 2009). Além de as células epiteliais estarem em constante contato com o ambiente, sendo assim, um importante alvo para substâncias presentes no mesmo.

Os danos no DNA das células dos mineiros de Candiota parecem estar associados com as concentrações de metais observadas por PIXE (Capítulo III). Em nosso estudo, foi observado nas amostras de sangue de mineiros de carvão de Candiota um aumento nos valores de magnésio, alumínio, cobre, zinco, enquanto que em amostras de solo foi observada a presença maior de fósforo, enxofre e chumbo. Rojas *et al.* (1996) (Rojas *et al.*, 1996) sugerem que a presença de metais induza quebras de DNA, que apesar deste tipo de dano poder ser logo reparado, as exposições crônicas podem representar uma forma de que lesões contínuas podem realmente lesar o DNA de forma irreversível. Além da presença de metais, Da Silva *et al.* (2000) e Dallarosa *et al.* (2005) demonstraram

que as amostras ambientais de *Candida* apresentaram elevadas concentrações de hidrocarbonetos. HAP podem induzir lesões ao DNA, como quebras de fita simples através de mecanismos de reparo do DNA (Brescia *et al.*, 1999; Pavanello *et al.*, 2005b; Rojas *et al.*, 2000), além de seus metabólitos eletrofilicos interagirem covalentemente com o DNA (Pereira-Neto *et al.*, 2000; Singh *et al.*, 2007) formando aductos com purinas, especialmente com a guanina após ativação metabólica por complexo enzimático P450 (Baird *et al.*, 2005).

Células epiteliais e macrófagos são os alvos primários de partículas inalados de pó de carvão. Macrófagos ativados produzem quantidades excessivas de espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species* – ROS) e citocinas (toxicidade pela fagocitose). ROS possuem, reconhecidamente, um importante papel na genotoxicidade de partículas, que podem derivar de propriedades de superfície, da presença de metais de transição, e da mobilização de ferro intracelular, como também da peroxidação lipídica (Schins, 2002). Em estudos *in vitro* têm levado à identificação de principais propriedades genotóxicas induzidas por partículas, já recentes estudos *in vivo*, fornecem um apoio adicional para a correlação entre inflamação pulmonar induzida por partículas e genotoxicidade.

A formação de ROS a partir de células inflamatórias é considerada como um biomarcador da genotoxicidade de partículas não fibrosas, como o pó de carvão. Quando há uma produção excessiva de ROS, ou quando há insuficiência de mecanismos de defesa *in vivo*, o estresse oxidativo pode ocorrer. Esse estresse pode resultar em peroxidação lipídica, modificação de proteínas, ruptura da membrana, e dano mitocondrial (Zhai *et al.*, 2002), assim todas as modificações que possam afetar os níveis de danos citogenéticos. Os danos causados por ROS são reconhecidos por glicosilases de DNA, endonucleases envolvidas em mecanismos de reparação da excisão de bases (BER), e, em alguns casos, envolvidas em mecanismos de reparação por excisão de nucleótidos (NER), conduzindo também a quebras no DNA (Sander & Wilson, 2005).

Em resposta aos contaminantes, várias defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas protegem as células e tecidos de danos oxidativos (Kinnula & Crapo, 2003; Ray *et al.*, 2012). Entre as enzimas estão as formas citoplasmáticas e mitocondriais da superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). Além da mensuração das atividades destas enzimas, outras técnicas vem sendo utilizadas para a medir o estresse oxidativo, com as que baseiam-se na detecção de produtos ou alterações fisiológicas, onde se inclui a determinação dos produtos de reação do ácido de reação com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) resultante da peroxidação lipídica das membranas celulares (Beckman & Ames, 1998).

Nossos resultados (Capítulo II) demonstraram níveis mais elevados de SOD em indivíduos expostos a carvão, correspondendo a uma resposta enzimática destes indivíduos a exposição ao carvão. Enquanto que nos resultados de CAT, os menores resultados foram observados em indivíduos expostos, o que podem indicar um não envolvimento desta enzima na resposta ao estresse oxidativo devido exposição do carvão. Por outro lado, os níveis mais baixos de TBARS nos indivíduos expostos pode ser explicado pela exposição crônica que estes indivíduos estão submetidos, reduzindo assim os níveis de peroxidação lipídica. Já foram demonstrados aumento da formação de 8-OHdG em linfócitos de sangue periférico e alteração da capacidade antioxidante em mineiros de carvão (Schins & Borm, 1999; Schins *et al.*, 1995).

O hematócrito, que é uma medição de eritrócitos no sangue total, é também utilizado como um indicador de agente tóxico e estresse oxidativo (Ajmani *et al.*, 2003). Nossos resultados demonstraram um aumento da porcentagem do hematócrito em indivíduos expostos quando comparados com indivíduos não expostos (Capítulo II). Já foi demonstrado que o estresse oxidativo contribui para mudanças nos parâmetros hematológicos, incluindo aumentos do hematócrito, sangue total e plasma, de viscosidade e rigidez de glóbulos vermelhos, este último que pode afetar o transporte de oxigênio nos tecidos, bem como sua função (Ajmani *et al.*, 2003).

A Figura 9 representa os processos celulares que podem influenciar a produção de ROS. Nossos resultados, frente ao exposto até aqui, nos levam a sugerir que todas estas rotas estejam envolvidas na formação de ROS pela exposição ao carvão, e que estejam envolvidas na genotoxicidade e mutagenicidade observadas.



Figura 9. Processos celulares que influenciam a produção de espécies reativas de oxigênio – ROS.

A resposta individual ao estresse pode variar de acordo com várias condições, tais como a combinação de polimorfismo genéticos, em genes de metabolismo de agentes genotóxicos e de reparo de DNA (Norppa, 1997). Em relação aos polimorfismos de metabolização (Capítulo II), observamos que os polimorfismos nos genes *GSTM1* e *GSTT1*, em indivíduos ocupacionalmente expostos ao carvão, não afetaram a frequência de MN ou demais parâmetros de BMCyt, exceto a frequência de brotos nucleares. Aumento significativo da frequência de brotos nucleares em células diferenciadas foi observado em indivíduos com genótipo *GSTM1* nulo em relação a indivíduos com genótipo *GSTM1* não nulo. As enzimas GST estão envolvidas no metabolismo de xenobióticos, entre eles carcinogênicos presentes no ambiente, ROS e agentes quimioterápicos (Hayes *et al.*, 2005; Strange *et al.*, 2001). Rossi *et al.* (2009) não encontraram qualquer associação significativa entre genótipos de GST e um biomarcador de efeito (Rossi *et al.*, 2009). O mecanismo de formação dos brotos nucleares é desconhecido, mas acredita-se que pode estar relacionado com a eliminação de DNA amplificado ou complexos de reparo de DNA (Shimizu *et al.*, 2005).

Os vários tipos de danos no DNA são reparados através de diferentes vias, entre as quais a via de Reparo por Excisão de Base (BER) é a principal via para a remoção de bases danificadas e quebras simples de DNA em células humanas. Esta via é um processo com vários passos, onde estão envolvidas várias proteínas.

A proteína OGG1 atua na primeira etapa de BER, catalisando a excisão das purinas oxidadas, incluindo 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxoG), e de anel aberto das purinas (Yamane *et al.*, 2004). Capacidade reduzida para se remover 8-oxoG pode levar a indução de aumento de mutações. Estudos sobre o efeito do polimorfismo *OGG1 Ser326Cys* em várias populações demonstraram que o alelo Cys tem uma menor atividade de reparo do que o alelo de tipo selvagem (Ito *et al.*, 2002; Yamane *et al.*, 2004). Evidências sugerem que isso é devido à capacidade de reparo reduzida, especialmente em condições oxidantes, mas o mecanismo subjacente é mal compreendido (Kershaw & Hodges, 2012). Apesar de nossos resultados (Capítulo IV) não mostraram diferença significativa entre

genótipos *OGG1* sobre o Ensaio do Cometa e parâmetros BMCyt, indivíduos expostos com alelo variante (*OGG1 Cys*) apresentaram um dano maior DNA detectados pelo Ensaio Cometa em relação aos indivíduos portadores do alelo do tipo selvagem, *OGG1 Ser*. Em estudo prévio, encontramos resultados semelhantes, com uma amostra de indivíduos expostos a pesticidas (Rohr *et al.*, 2011). As quebras de DNA observadas podem refletir danos intermediários de reparo por BER como um resultado de uma menor atividade da enzima. Nossos resultados estão de acordo com outros estudos e sugerem que o alelo *OGG1 Cys* pode ter menor capacidade para suprimir a mutação, e pode ser considerado como fator de risco para o desenvolvimento de diferentes tipos de câncer (Ito *et al.*, 2002; Kohno *et al.*, 1998; Takezaki *et al.*, 2002; Yamane *et al.*, 2004).

Em relação à exposição de carvão, até o momento, poucos estudos foram realizados. Em uma exposição a níveis elevados de HAP devido ao uso de carvão, a presença do alelo *OGG1Cys* levou ao aumento do risco de desenvolvimento de câncer de pulmão (*odds ratio* de 1,9 – IC 95% = 1,1-3,) (Lan *et al.*, 2004). Zhai *et al.* (2002) não associam o polimorfismo Ser326Cys *OGG1* com o desenvolvimento de pneumoconiose, em mineiros de carvão (Zhai *et al.*, 2002).

Enquanto que a proteína XRCC1 desempenha um papel importante na via de BER, agindo como um *scaffold*, coordenando as demais proteínas envolvidas na via BER, como a DNA polimerase β , a DNA-ligase III e a polimerase poli-ADP-ribose (PARP) (Frosina, 2004). O polimorfismo *XRCC1 Arg194Trp*, que ocorre na região de ligação ao antígeno nuclear de proliferação celular, tem sido sugerido como fator para a melhora da capacidade individual de reparo de DNA (revisto em Frosina, 2004). Nos nossos resultados (Capítulo IV) indivíduos expostos, o polimorfismo *XRCC1* não apresentou influência sobre os parâmetros de BMCyt. Enquanto que, no grupo não exposto, o genótipo *XRCC1* variante (*XRCC1 Arg/Trp*) mostrou um efeito protetor sobre a frequência de células cariorréticas e picnóticas, os quais são biomarcadores de morte celular.

O mecanismo de BER pode levar a quebras de fita simples que podem representar um sério risco para as células, se não forem preenchidos por uma

polimerase e ligados pela DNA ligase. De fato, durante replicação de DNA as quebras simples podem ser convertida em quebras duplas de DNA e isso pode gerar instabilidade genômica e em algumas circunstâncias induzir parada do ciclo celular e apoptose (Sterpone & Cozzi, 2010)

Estudos demonstraram que a exposição ambiental pode regular negativamente a expressão de alguns genes de reparo de DNA, incluindo *XRCC1*. Breton *et al.* (2007) sugerem que esta regulação pode ser alelo específico e o genótipo tipo selvagem é mais regulado do que o heterozigoto *XRCC1* ou variantes homozigotos. Assim, o genótipo variante seria um fator de proteção contra o acúmulo de quebras de DNA, uma vez que o reparo de DNA seria inibido de forma mais eficaz em indivíduos com o genótipo selvagem. O efeito protetor do alelo variante *XRCC1 Trp* tem sido observado para diferentes tipos de câncer, como o de bexiga, mama, pulmão e câncer de estômago, no entanto, associação inversa foi detectada em estudos de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (SCCHN), gastrite crônica, úlcera gástrica e câncer de pulmão (Breton *et al.*, 2007; Duarte *et al.*, 2005; Goode *et al.*, 2002; Hu *et al.*, 2005; Hung *et al.*, 2005; Shen *et al.*, 2000; Stern *et al.*, 2001; Sturgis *et al.*, 1999).

Uma das dificuldades que pesquisadores enfrentam tem sido identificar individualmente os compostos que podem ser responsáveis por efeitos adversos associados à exposição a agentes ambientais. Outro ponto é que, embora significativo o aumento dos efeitos genotóxicos, é difícil de prever de forma individual para cada sujeito, evidenciando que os resultados positivos de estudos de biomonitoramento sugerem um perigo genotóxico no nível do grupo. Em conclusão, o presente estudo sugere que a exposição ocupacional ao carvão, e seus derivados de queima, visto que Candiota possui uma usina termelétrica, que os mineiros estão sujeitos, está associada a danos genéticos, observados pelo Ensaio Cometa e Teste de MN (linfócitos e mucosa oral). Tais danos ao DNA podem ser uma consequência de danos oxidativos, observados por aumento de SOD e hematócrito, resultante dos componentes de carvão, incluindo metais (observado por PIXE) e hidrocarbonetos. Quanto à suscetibilidade genética aos danos, o genótipo *GSTM1* nulo parece ser um fator de risco para a formação de brotos nucleares em células de mucosa oral, enquanto que os polimorfismos

OGG1 Ser326Cys e *XRCC1 Arg194Trp* não apresentaram influencia nos danos ao DNA. Neste contexto, deve-se aumentar o tamanho amostral poderá aumentar a sensibilidade de dados em estudos posteriores, além disso, seria interessante incluir outros biomarcadores de suscetibilidade. A evidência de um risco genético relacionado à exposição resultante do carvão e derivados exposição salienta a necessidade de programas educacionais para os mineiros de carvão, a fim de implementar medidas de proteção.

2. CONCLUSÃO

Com tudo, podemos concluir que:

- O Ensaio Cometa demonstrou que a exposição ocupacional ao carvão leva a efeito genotóxico;
- A exposição ao carvão apresenta efeito mutagênico, sendo observado pelos testes de MN em linfócitos e BMCyt;
- No teste BMCyt foi demonstrada também a indução de morte celular pela exposição;
- O estresse oxidativo ocasionado pela exposição ao carvão pode ser verificado através da atividade de SOD;
- CAT parece não estar envolvida na resposta a exposição ao carvão;
- A exposição ocupacional ao carvão, por ser uma exposição crônica, neste estudo, não apresentou relação com a peroxidação lipídica;
- O polimorfismos de metabolização *GSTT1 nulo* não afetou a frequência de MN ou demais parâmetros de BMCyt;
- O polimorfismo de metabolização *GSTM1 nulo* levou a susceptibilidade para a formação de brotos nucleares, em indivíduos ocupacionalmente expostos ao carvão;
- Os polimorfismos da via BER, *OGG1 Ser326Cys* e *XRCC1 Arg194Trp*, não apresentaram influência nos danos ao DNA pela exposição ao carvão.

REFERÊNCIAS

- Ajmani RS, Fleg JL, Demehin AA, Wright JG, O'Connor F, Heim JM, Tarien E and Rifkind JM (2003) Oxidative stress and hemorheological changes induced by acute treadmill exercise. *Clin Hemorheol Microcirc* 28:29-40.
- Amorin L (2003) O Uso dos Biomarcadores na Avaliação da Exposição Ocupacional a Substâncias Químicas. *Revista brasileira de epidemiologia* 6:13.
- ANEEL (2002) Atlas de energia elétrica do Brasil 1ª edition, Brasilia, 153 pp.
- ANEEL (2008) Atlas de energia elétrica do Brasil. 3ª edition. ANEEL, Brasilia, 153 pp.
- Baird WM, Hooven LA and Mahadevan B (2005) Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action. *Environ Mol Mutagen* 45:106-114.
- Beckman KB and Ames BN (1998) The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev* 78:547-581.
- Bonassi S and Au WW (2002) Biomarkers in molecular epidemiology studies for health risk prediction. *Mutat Res* 511:73-86.
- Brescia G, Celotti L, Clonfero E, Neumann GH, Forni A, Foa V, Pisoni M, Ferri GM and 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 CV, Zhou W, Kile ML, Houseman EA, Quamruzzaman Q, Rahman M, Mahiuddin G and Christiani DC (2007) Susceptibility to arsenic-induced skin lesions from polymorphisms in base excision repair genes. *Carcinogenesis* 28:1520-1525.
- Cebulska-Wasilewska A (2003) Response to challenging dose of X-rays as a predictive assay for molecular epidemiology. *Mutat Res* 544:289-297.
- Celik M, Donbak L, Unal F, Yuzbasioglu D, Aksoy H and Yilmaz S (2007) Cytogenetic damage in workers from a coal-fired power plant. *Mutat Res* 627:158-163.
- Cherng SH, Lin ST and Lee H (1996) Modulatory effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on the mutagenicity of 1-nitropyrene: a structure-activity relationship study. *Mutat Res* 367:177-185.
- da Silva J, de Freitas TR, Heuser V, Marinho JR and Erdtmann B (2000a) Genotoxicity biomonitoring in coal regions using wild rodent *Ctenomys torquatus* by Comet assay and micronucleus test. *Environ Mol Mutagen* 35:270-278.
- da Silva J, Freitas TRO, Marinho JR, Speit G and Erdtmann B (2000b) An Alkaline single-cell gel electrophoresis (comet) assay for environmental

- biomonitoring with native rodents. *Genetics and Molecular Biology* 23:241-245.
- Dallarosa JB, Teixeira EC, Pires M and Fachel J (2005) Study of the profile of polycyclic aromatic hydrocarbons in atmospheric particles (PM10) using multivariate methods. *Atmospheric Environment* 39:10.
- De Celis R, Pedron-Nuevo N, Gonzalez-Unzaga M, Fugarolas-Marin J and Feria-Velasco A (2005) Increased frequency of micronuclei in immature seminal germinal cells of male workers exposed to aromatic hydrocarbons. *Fertil Steril* 84:808-810.
- De Ruyck K, Van Eijkeren M, Claes K, Morthier R, De Paepe A, Vral A, De Ridder L and Thierens H (2005) Radiation-induced damage to normal tissues after radiotherapy in patients treated for gynecologic tumors: association with single nucleotide polymorphisms in XRCC1, XRCC3, and OGG1 genes and in vitro chromosomal radiosensitivity in lymphocytes. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 62:1140-1149.
- DNPM, 2001 *Balanço Mineral Brasileiro 2001* pp., edited by DNPM, Brasilia.
- DNPM (2009) *Economia Mineral do Brasil*. . DNPM, Brasilia
- Donbak L, Rencuzogullari E, Yavuz A and Topaktas M (2005) The genotoxic risk of underground coal miners from Turkey. *Mutat Res* 588:82-87.
- Duarte MC, Colombo J, Rossit AR, Caetano A, Borim AA, Wornrath D and Silva AE (2005) Polymorphisms of DNA repair genes XRCC1 and XRCC3, interaction with environmental exposure and risk of chronic gastritis and gastric cancer. *World J Gastroenterol* 11:6593-6600.
- Dusinska M and Collins AR (2008) The comet assay in human biomonitoring: gene-environment interactions. *Mutagenesis* 23:191-205.
- Efferth T and Volm M (2005) Pharmacogenetics for individualized cancer chemotherapy. *Pharmacol Ther* 107:155-176.
- Energética BEdP (2011) *Balanço Energético Nacional 2011 – Ano base 2010: Resultados Preliminares*. EPE, Rio de Janeiro, 49 pp.
- Fenech M (2007) Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat Protoc* 2:1084-1104.
- Fritschi L, Benke G, Hughes AM, Krickler A, Turner J, Vajdic CM, Grulich A, Milliken S, Kaldor J and Armstrong BK (2005) Occupational exposure to pesticides and risk of non-Hodgkin's lymphoma. *Am J Epidemiol* 162:849-857.
- Frosina G (2004) Commentary: DNA base excision repair defects in human pathologies. *Free Radic Res* 38:1037-1054.
- Gibson J (1979) Coal - an introduction to its formation and properties. In: Pitt GJ and Millward GR (eds) *Coal and Modern Coal Processing: An Introduction*. Academic Press

- Goode EL, Ulrich CM and Potter JD (2002) Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11:1513-1530.
- Granella M and Clonfero E (1992) Sensitivity of different bacterial assays in detecting mutagens in urine of humans exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutat Res* 268:131-137.
- Gu ZW, Whong WZ, Wallace WE and Ong TM (1992) Induction of micronuclei in BALB/c-3T3 cells by selected chemicals and complex mixtures. *Mutat Res* 279:217-222.
- Gutteridge JM and Halliwell B (2000) Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann N Y Acad Sci* 899:136-147.
- Hasspieler BM, Ali FN, Alipour M, Haffner GD and Adeli K (1995) Human bioassays to assess environmental genotoxicity: development of a DNA break bioassay in HepG2 cells. *Clin Biochem* 28:113-116.
- Hayes JD, Flanagan JU and Jowsey IR (2005) Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45:51-88.
- He JL, Jin HY, Jin LF and Gao SY (2000) Monitoring of human exposure to radiation with the binucleated lymphocyte micronucleus assay. *Biomed Environ Sci* 13:32-36.
- Heuser VD, Erdtmann B, Kvitko K, Rohr P and da Silva J (2007) Evaluation of genetic damage in Brazilian footwear-workers: biomarkers of exposure, effect, and susceptibility. *Toxicology* 232:235-247.
- Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, Knasmueller S and Fenech M (2008) The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. *Mutat Res* 659:93-108.
- Hopkins WA, Mendonca MT and Congdon JD (1999) Responsiveness of the hypothalamo-pituitary-interrenal axis in an amphibian (*Bufo terrestris*) exposed to coal combustion wastes. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 122:191-196.
- Hu Z, Ma H, Chen F, Wei Q and Shen H (2005) XRCC1 polymorphisms and cancer risk: a meta-analysis of 38 case-control studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14:1810-1818.
- Hung RJ, Hall J, Brennan P and Boffetta P (2005) Genetic polymorphisms in the base excision repair pathway and cancer risk: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 162:925-942.
- Ito H, Hamajima N, Takezaki T, Matsuo K, Tajima K, Hatooka S, Mitsudomi T, Suyama M, Sato S and Ueda R (2002) A limited association of OGG1 Ser326Cys polymorphism for adenocarcinoma of the lung. *J Epidemiol* 12:258-265.
- Jose Zocche J, Dimer Leffa D, Paganini Damiani A, Carvalho F, Avila Mendonca R, Dos Santos CE, Appel Bouffleur L, Ferraz Dias J and de Andrade VM

- (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.
- Kershaw RM and Hodges NJ (2012) Repair of oxidative DNA damage is delayed in the Ser326Cys polymorphic variant of the base excision repair protein OGG1. *Mutagenesis*.
- Keshava N and Ong TM (1999) Occupational exposure to genotoxic agents. *Mutat Res* 437:175-194.
- Kinnula VL and Crapo JD (2003) Superoxide dismutases in the lung and human lung diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 167:1600-1619.
- Kohno T, Shinmura K, Tosaka M, Tani M, Kim SR, Sugimura H, Nohmi T, Kasai H and Yokota J (1998) Genetic polymorphisms and alternative splicing of the hOGG1 gene, that is involved in the repair of 8-hydroxyguanine in damaged DNA. *Oncogene* 16:3219-3225.
- Kumar A, Yadav A, Giri SK, Dev K, Gautam SK, Gupta R and Aggarwal N (2011) Effect of genetic polymorphism of GSTM1 and GSTT1 genotypes on cytogenetic biomarkers among coaltar workers. *Environ Toxicol Pharmacol* 32:128-135.
- Lan Q, Mumford JL, Shen M, Demarini DM, Bonner MR, He X, Yeager M, Welch R, Chanock S, Tian L *et al.* (2004) Oxidative damage-related genes AKR1C3 and OGG1 modulate risks for lung cancer due to exposure to PAH-rich coal combustion emissions. *Carcinogenesis* 25:2177-2181.
- Leffa DD, Damiani AP, da Silva J, Zocche JJ, dos Santos CE, Bouffleur LA, Dias JF and de Andrade VM (2010) Evaluation of the genotoxic potential of the mineral coal tailings through the *Helix aspersa* (Muller, 1774). *Arch Environ Contam Toxicol* 59:614-621.
- Leng S, Dai Y, Niu Y, Pan Z, Li X, Cheng J, He F and Zheng Y (2004) Effects of genetic polymorphisms of metabolic enzymes on cytokinesis-block micronucleus in peripheral blood lymphocyte among coke-oven workers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 13:1631-1639.
- Leon-Mejia G, Espitia-Perez L, Hoyos-Giraldo LS, Da Silva J, Hartmann A, Henriques JA and 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.
- Leon G, Perez LE, Linares JC, Hartmann A and Quintana M (2007) Genotoxic effects in wild rodents (*Rattus rattus* and *Mus musculus*) in an open coal mining area. *Mutat Res* 630:42-49.
- Leonard A, Deknudt G, Leonard ED and Decat G (1984) Chromosome aberrations in employees from fossil-fueled and nuclear-power plants. *Mutat Res* 138:205-212.
- Lowry LK (1995) Role of biomarkers of exposure in the assessment of health risks. *Toxicol Lett* 77:31-38.

- Mally A and Chipman JK (2002) Non-genotoxic carcinogens: early effects on gap junctions, cell proliferation and apoptosis in the rat. *Toxicology* 180:233-248.
- Maluf SW and Erdtmann B (2003) Biomonitoramento do Dano Genético em Humanos. In: Da Silva J, Erdtmann B and Henriques JAP (eds) *Genética Toxicológica*. Editora Alcance, Porto Alegre, pp 307-321.
- Mamuya SH, Bratveit M, Mashalla Y and Moen BE (2007) High prevalence of respiratory symptoms among workers in the development section of a manually operated coal mine in a developing country: a cross sectional study. *BMC Public Health* 7:17.
- McDaniel BB, Jones RA, Scherz H, Kirsch AJ, Little SB and Grattan-Smith JD (2005) Dynamic contrast-enhanced MR urography in the evaluation of pediatric hydronephrosis: Part 2, anatomic and functional assessment of uteropelvic junction obstruction. *AJR Am J Roentgenol* 185:1608-1614.
- Minissi S and Lombi E (1997) Heavy metal content and mutagenic activity, evaluated by *Vicia faba* micronucleus test, of Tiber river sediments. *Mutat Res* 393:17-21.
- Moriske HJ, Drews M, Ebert G, Menk G, Scheller C, Schondube M and Konieczny L (1996) Indoor air pollution by different heating systems: coal burning, open fireplace and central heating. *Toxicol Lett* 88:349-354.
- Norppa H (1997) Cytogenetic markers of susceptibility: influence of polymorphic carcinogen-metabolizing enzymes. *Environ Health Perspect* 105 Suppl 4:829-835.
- Norppa H (2001) Genetic polymorphisms and chromosome damage. *Int J Hyg Environ Health* 204:31-38.
- Oliveira PPV, B. SC, Moura L, Malta DC, Torres MCA, Lima SMCP, Lima ALA, Leite CE, Costa-e-Silva VL, Sobel J *et al.* (2010) First reported outbreak of green tobacco sickness in Brazil. *Caderno de Saúde Pública* 26:2263-2269.
- Omenn GS (1991) Future research directions in cancer ecogenetics. *Mutat Res* 247:283-291.
- Pastor S, Creus A, Parron T, Cebulska-Wasilewska A, Siffel C, Piperakis S and Marcos R (2003) Biomonitoring of four European populations occupationally exposed to pesticides: use of micronuclei as biomarkers. *Mutagenesis* 18:249-258.
- Pavanello M, Mennucci B and Ferrarini A (2005a) Quantum-mechanical studies of NMR properties of solutes in liquid crystals: a new strategy to determine orientational order parameters. *J Chem Phys* 122:064906.
- Pavanello S, Pulliero A, Lai A, Gaiardo A, Mastrangelo G and Clonfero E (2005b) [Anti-B[a]PDE-DNA formation in lymphomonocytes of humans environmentally exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons]. *G Ital Med Lav Ergon* 27:312-314.

- Pavanello S, Pulliero A, Siwinska E, Mielzynska D and Clonfero E (2005c) 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.
- Peralba MCR, 1990 Caracterização química dos hidrocarbonetos de betumes de carvões sul-brasileiros, pp. 126 in *Instituto de Física e Química de São Carlos*. Universidade de São Paulo, São Carlos.
- Pereira-Neto AD, Moreira JC, Dias AEXO, Arbilla G, Ferreira LFV, Oliveira AS and Berek J (2000) Avaliação da Contaminação Humana por Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAS) e seus Derivados Nitrados (NHPAS): Uma Revisão Metodológica. *Quim. Nova* 23:9.
- Pindborg JJ, Reibel J, Roed-Peterson B and Mehta FS (1980) Tobacco-induced changes in oral leukoplakic epithelium. *Cancer* 45:2330-2336.
- Pivetta F, Machado JMH, Araújo UC, Moreira MFR and Apostoli P (2001) Monitoramento biológico: conceitos e aplicações em saúde pública. *Cad Saude Publica* 17:10.
- Ray PD, Huang BW and Tsuji Y (2012) Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal* 24:981-990.
- Richiardi L, Mirabelli D, Calisti R, Ottino A, Ferrando A, Boffetta P and Merletti F (2006) Occupational exposure to diesel exhausts and risk for lung cancer in a population-based case-control study in Italy. *Ann Oncol* 17:1842-1847.
- Rohr P, da Silva J, Erdtmann B, Saffi J, Guecheva TN, Antonio Pegas Henriques J and Kvitko K (2011) BER gene polymorphisms (OGG1 Ser326Cys and XRCC1 Arg194Trp) and modulation of DNA damage due to pesticides exposure. *Environ Mol Mutagen* 52:20-27.
- Rojas E, Valverde M, Sordo M, Altamirano-Lozano P and Ostrosky-Wegman P (1996) Single cell gel electrophoresis assay in the evaluation of metal carcinogenicity. In: Collery P, Corbella J, Domingo JL, Etienne J-C and Llobet JM (eds) *Metal Ions in Biology and Medicine*. John Libbey Eurotext, Spain, pp 375-377.
- Rojas M, Cascorbi I, Alexandrov K, Kriek E, Auburtin G, Mayer L, Kopp-Schneider A, Roots I and Bartsch H (2000) Modulation of benzo[a]pyrene diol-epoxide-DNA adduct levels in human white blood cells by CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 polymorphism. *Carcinogenesis* 21:35-41.
- Rossi AM, Hansteen IL, Skjelbred CF, Ballardín M, Maggini V, Murgia E, Tomei A, Viarengo P, Knudsen LE, Barale R *et al.* (2009) Association between frequency of chromosomal aberrations and cancer risk is not influenced by genetic polymorphisms in GSTM1 and GSTT1. *Environ Health Perspect* 117:203-208.
- Sanchez-Siles M, Ros-Llor I, Camacho-Alonso F and Lopez-Jornet P (2011) A novel application of the buccal micronucleus cytome assay in oral lichen planus: A pilot study. *Arch Oral Biol*.

- Sander M and Wilson S (2005) Base Excision Repair, AP Endonucleases and DNA Glycosylases. . In(eds) eLS. John Wiley & Sons Ltd, Chichester.
- Saúde Md (1999) Diagnóstico e Manejo das Doenças Relacionadas com o Trabalho: Manual de Procedimentos para os Serviços de Saúde. Ministério da Saúde, Brasília
- Schins RP (2002) Mechanisms of genotoxicity of particles and fibers. *Inhal Toxicol* 14:57-78.
- Schins RP and Borm PJ (1999) Mechanisms and mediators in coal dust induced toxicity: a review. *Ann Occup Hyg* 43:7-33.
- Schins RP, Schilderman PA and Borm PJ (1995) Oxidative DNA damage in peripheral blood lymphocytes of coal workers. *Int Arch Occup Environ Health* 67:153-157.
- Shen H, Xu Y, Qian Y, Yu R, Qin Y, Zhou L, Wang X, Spitz MR and Wei Q (2000) Polymorphisms of the DNA repair gene XRCC1 and risk of gastric cancer in a Chinese population. *Int J Cancer* 88:601-606.
- Shimizu N, Shingaki K, Kaneko-Sasaguri Y, Hashizume T and Kanda T (2005) When, where and how the bridge breaks: anaphase bridge breakage plays a crucial role in gene amplification and HSR generation. *Exp Cell Res* 302:233-243.
- Siemiatycki J, Richardson L, Straif K, Latreille B, Lakhani R, Campbell S, Rousseau MC and Boffetta P (2004) Listing occupational carcinogens. *Environ Health Perspect* 112:1447-1459.
- Singh R, Sram RJ, Binkova B, Kalina I, Popov TA, Georgieva T, Garte S, Taioli E and Farmer PB (2007) The relationship between biomarkers of oxidative DNA damage, polycyclic aromatic hydrocarbon DNA adducts, antioxidant status and genetic susceptibility following exposure to environmental air pollution in humans. *Mutat Res* 620:83-92.
- Siwinska E, Mielzynska D and Kapka L (2004) Association between urinary 1-hydroxypyrene and genotoxic effects in coke oven workers. *Occup Environ Med* 61:e10.
- Sram RJ, Hola N, Kotesovec F and Novakova A (1985) Cytogenetic analysis of peripheral blood lymphocytes in glass workers occupationally exposed to mineral oils. *Mutat Res* 144:277-280.
- Stern MC, Umbach DM, van Gils CH, Lunn RM and Taylor JA (2001) DNA repair gene XRCC1 polymorphisms, smoking, and bladder cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10:125-131.
- Sterpone S and Cozzi R (2010) Influence of XRCC1 Genetic Polymorphisms on Ionizing Radiation-Induced DNA Damage and Repair. *J Nucleic Acids* 2010.
- Stierum RH, Hageman GJ, Welle IJ, Albering HJ, Schreurs JG and Kleinjans JC (1993) Evaluation of exposure reducing measures on parameters of genetic risk in a population occupationally exposed to coal fly ash. *Mutat Res* 319:245-255.

- Strange RC, Spiteri MA, Ramachandran S and Fryer AA (2001) Glutathione-S-transferase family of enzymes. *Mutat Res* 482:21-26.
- Sturgis EM, Castillo EJ, Li L, Zheng R, Eicher SA, Clayman GL, Strom SS, Spitz MR and Wei Q (1999) Polymorphisms of DNA repair gene XRCC1 in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Carcinogenesis* 20:2125-2129.
- Sutou S (1996) Achievements by CSGMT/JEMS.MMS: the Collaborative Study Group for the Micronucleus Test in the Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan. *Mutat Res* 340:151-174.
- Swenberg JA (1993) Cell Proliferation and Chemical Carcinogenesis: summary and future directions. *Environ Health Perspect* 101:153-158.
- Takezaki T, Gao CM, Wu JZ, Li ZY, Wang JD, Ding JH, Liu YT, Hu X, Xu TL, Tajima K *et al.* (2002) hOGG1 Ser(326)Cys polymorphism and modification by environmental factors of stomach cancer risk in Chinese. *Int J Cancer* 99:624-627.
- Thomas P, Harvey S, Gruner T and Fenech M (2008) The buccal cytome and micronucleus frequency is substantially altered in Down's syndrome and normal ageing compared to young healthy controls. *Mutat Res* 638:37-47.
- Thomas P, Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, Knasmueller S and Fenech M (2009) Buccal micronucleus cytome assay. *Nat Protoc* 4:825-837.
- Thulstrup AM and Bonde JP (2006) Maternal occupational exposure and risk of specific birth defects. *Occup Med (Lond)* 56:532-543.
- Vaktskjold A, Talykova LV and Nieboer E (2011) Congenital anomalies in newborns to women employed in jobs with frequent exposure to organic solvents--a register-based prospective study. *BMC Pregnancy Childbirth* 11:83.
- Vale MGR, 1997 Hidrocarbonetos poliaromáticos em derivados de carvão brasileiro, pp. 190 in *Programa de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica e dos Materiais*. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Verschaeve L and Gilles J (1995) Single cell gel electrophoresis assay in the earthworm for the detection of genotoxic compounds in soils. *Bull Environ Contam Toxicol* 54:112-119.
- Villela IV, de Oliveira IM, da Silva J and Henriques JA (2006) DNA damage and repair in haemolymph cells of golden mussel (*Limnoperna fortunei*) exposed to environmental contaminants. *Mutat Res* 605:78-86.
- Villela IV, Lau A, Silveira J, Pra D, Rolla HC and Silveira JD (2003) Reparação de DNA em células Eucarióticas. In: da Silva J, Erdtmann B and Henriques JA (eds) *Genética Toxicológica*. Alcance, Porto Alegre, pp 140-163.

- Ward EM, Schulte PA, Bayard S, Blair A, Brandt-Rauf P, Butler MA, Dankovic D, Hubbs AF, Jones C, Karstadt M *et al.* (2003) Priorities for development of research methods in occupational cancer. *Environ Health Perspect* 111:1-12.
- White PA (2002) The genotoxicity of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in complex mixtures. *Mutat Res* 515:85-98.
- Wilkinson J and Clapper ML (1997) Detoxification enzymes and chemoprevention. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 216:192-200.
- Yamane A, Kohno T, Ito K, Sunaga N, Aoki K, Yoshimura K, Murakami H, Nojima Y and 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.
- Zhai R, Liu G, Ge X, Yang C, Huang C, Wu C and Christiani DC (2002) Genetic polymorphisms of MnSOD, GSTM1, GSTT1, and OGG1 in coal workers' pneumoconiosis. *J Occup Environ Med* 44:372-377.
- Zhou HC, Jin BS, Zhong ZP, Huang YJ, Xiao R and Li DJ (2005) Investigation of polycyclic aromatic hydrocarbons from coal gasification. *J Environ Sci (China)* 17:141-145.

ANEXOS

ANEXO 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

1. Dados de Identificação do Projeto de Pesquisa

1.1. Título: Avaliação do Risco Ocupacional em Trabalhadores de Minas de carvão do estado do Rio Grande do Sul

1.2. Unidade executora: Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Campus do Vale, Porto Alegre – RS.

1.3. Locais de coleta: Municípios com atividade de mineração no Estado do Rio Grande do Sul.

1.4. Pesquisadores: Profa. Dra. Kátia Kvitko
 Profa. Dra. Juliana da Silva
 Msc. Paula Rohr

Endereço para contato: katia.kvitko@ufrgs.br

Telefone: (51) 3308-6740 ou

Comitê de Ética em Pesquisa UFRGS:(51) 3308-4085

1.5. Objetivos do projeto: avaliar a genotoxicidade em mineradores gaúchos correlacionando os resultados com a suscetibilidade genética individual e com os biomarcadores bioquímicos.

2. Informações ao voluntário

2.1. Participação no projeto: o voluntário participará deste projeto através da doação de sangue para realização de análises bioquímicas e genéticas. Além disso, deverá responder ao questionário específico (Anexo 2).

2.2. Duração da atividade: aproximadamente 30 minutos.

2.3. Riscos e desconfortos: não há riscos para o voluntário participante do projeto. O desconforto previsto resume-se à retirada de uma amostra de aproximadamente 10 ml de sangue venoso do braço direito ou esquerdo.

2.4. Benefícios esperados: os resultados do exame clínico e laboratorial serão comunicados ao voluntário que ficará ciente da presença ou não de resíduos de carvão no organismo.

2.5. Critérios de confidencialidade, privacidade e anonimato: todas as análises serão realizadas de forma confidencial, não sendo identificado o voluntário. Os resultados serão informados diretamente ao voluntário pela coordenação do projeto. As publicações não incluirão qualquer referência ao nome do doador ou outros dados que possam identificá-lo.

2.6. Destino do material biológico coletado: após a realização das análises químicas e bioquímicas as amostras de sangue serão descartadas, não podendo ser utilizadas para outros fins. As amostras de DNA ficarão armazenadas sob forma de banco de DNA anônimo no laboratório de Imunogenética da UFRGS, sob responsabilidade da Dra. Kátia Kvitko. As amostras de DNA poderão ser analisadas com outros marcadores moleculares, desde que o projeto específico seja reapresentado para aprovação junto ao Comitê de Ética em Pesquisa.

3. Consentimento do voluntário

Eu,....., após ler este documento e uma vez esclarecida a minha participação no projeto de pesquisa aqui referido, concordo em:

- a- responder adequadamente ao questionário em anexo;
- b- doar uma amostra de sangue venoso, coletada por profissional habilitado, com material totalmente descartável, a qual será utilizada para realização de análises químicas e bioquímicas com o objetivo de avaliar o nível de intoxicação por carvão;
- c- permitir raspagem da mucosa bucal, com material descartável, à realização do Teste de Micronúcleo.

E estou ciente que posso retirar o consentimento quando desejar sem prejuízos para mim.

Assinatura do voluntário:

Assinatura do coordenador do projeto:

Local e data:

ANEXO 2

Questionário pessoal

1. Idade: _____ em anos 2. Data de nascimento: ____/____/____
3. Sexo: ()M ()F 4. Grupo Étnico: () negro; () chinês; () japonês;
() outros orientais; () indígena; () latino-americano; () europeu; () asiático
5. Estado civil: _____ 6. N. de filhos: _____
7. Emprego anterior: _____ 8. Função que exercia: _____
9. No seu emprego anterior já se expôs a algumas destas substâncias?
(informe tempo de exposição): () derivados do petróleo _____ ;
() tintas/corantes _____ ; () solventes _____ ;
() pesticidas/herbicidas _____ () mercúrio/vapores de outros metais
pesados – quais? _____; () outras substâncias químicas –
quais? _____
10. Função atual: _____ 11. Tempo de serviço: _____
12. No seu emprego atual já se expôs a algumas destas substâncias? (informe
tempo de exposição): () derivados do petróleo _____ ;
() tintas/corantes _____ ; () solventes _____ ;
() pesticidas/herbicidas _____ ; () mercúrio/vapores de outros metais
pesados _____; () outras substâncias químicas _____
13. Utiliza equipamento de segurança: () sim () não _____
14. Você come durante o período de trabalho? () sim () não
15. Se sim, Lava as mãos antes de pegar nos alimentos? () sim () não
16. Já fumou? () sim () não – se não vá para 26 17. Quantos anos? _____
18. Ainda fuma? () sim () não – se não, há quantos anos parou? _____
19. Se sim, quantos cigarros por dia? () menos de meio maço; () de meio a um
maço; () 1-2 maços; () mais de 2 maços
20. Fuma também: () cigarros de palha () cachimbo – quantas vezes ao dia: _

21. Medicamentos utilizados rotineiramente / indicar a freqüência: () vitaminas e suplementos; () pílulas para pressão; () antibióticos; () insulina;
() tranqüilizantes; () relaxantes musculares; () outros: _____
22. Está fazendo algum tratamento? () sim () não – Qual? _____
23. Consome bebidas alcoólicas? () sim () não – Qual? Freqüência: _____
24. Ingere frutas e verduras? () sim () não – Qual? Freqüência: _____
25. Ingere carnes (não só vermelha)? () sim () não – Qual? Freqüência: _____
26. Preferência das carnes: () crua; () mal passada; () bem passada
() gorda; () magra
27. Doenças já contraídas: () câncer; () aids; () diabete; () anemia;
() doenças cardíacas; () outras _____
28. Tem conhecimento de algum defeito de nascimento ou doença hereditária que afetem seus pais, irmãos, irmãs ou cônjuges? () sim () não - _____
29. Você e cônjuge já tiveram dificuldades em conceber (mais de doze meses) ou já foram diagnosticados como estéreis? () sim () não - _____
30. Histórico de aborto espontâneo? () sim () não - _____
31. Histórico de bebês com defeitos? () sim () não - _____
32. Possui irmão gêmeo idêntico? () sim () não
33. Casos de câncer na família: () sim () não – grau de parentesco - _____
Tipos de cânceres: () pele; () mama; () leucemia; () esôfago; () outro _____

ANEXO 3



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
CARTA DE APROVAÇÃO**



O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul analisou o projeto:

Número : 2007978

Título : AVALIAÇÃO DO RISCO OCUPACIONAL EM TRABALHADORES DE MINAS DE CARVÃO DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL

Pesquisador (es) :

<u>NOME</u>	<u>PARTICIPAÇÃO</u>	<u>EMAIL</u>	<u>FONE</u>
KATIA KVITKO	PESQ RESPONSÁVEL	katia.kvitko@ufrgs.br	33087754
JULIANA DA SILVA	PESQUISADOR	juliana@if1.if.ufrgs.br	33087754
PAULA ROHR	PESQUISADOR	paularohr@yahoo.com.br	

O mesmo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS, reunião nº 39 , ata nº 119 ,de 20/11/2008 , por estar adequado ética e metodologicamente e de acordo com a Resolução 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde.

Porto Alegre, quinta-feira, 20 de novembro de 2008


ILMA SIMONI BRUM DA SILVA
Coordenador do CEP-UFRGS