

ESTUDO DE POLIMORFISMOS NOS GENES DE REPARO XRCC1 E XPD EM INDIVÍDUOS EXPOSTOS AOS AGROTÓXICOS

JUSCIELE BROGIN MORELI¹
DANIELE FERNANDES DA SILVA²
MAGALY SALES MONTEIRO³

1. Farmacêutica, Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, UNESP, Distrito de Rubião Junior s/n, Botucatu, SP.
2. Farmacêutica, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP, Av. do Café, s/n, Ribeirão Preto, SP.
3. Bióloga, Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, Distrito de Rubião Junior s/n, Botucatu, SP.

Autor responsável: J.B. Moreli. E-mail: juscielemoreli@yahoo.com.br

INTRODUÇÃO

A maioria das pessoas está inevitavelmente exposta a agrotóxicos, mas os trabalhadores rurais representam uma classe de destaque, pois sofrem exposição constante em seu ambiente de trabalho. Os agrotóxicos são formados por uma complexa mistura de diferentes tipos de substâncias químicas que, no homem, induzem instabilidades cromossômicas, principalmente deleções, translocações e ganho ou perda de cromossomos inteiros, contribuindo para o desenvolvimento de câncer (Bolognesi, 2003).

O câncer pode ser atribuído a múltiplos fatores que incluem contribuição genética, meio ambiente e estilo de vida. Entretanto, estudos epidemiológicos sobre a relação entre exposição a agrotóxicos e câncer humano têm mostrado resultados incertos. Alguns estudos já demonstraram uma associação entre inseticidas, herbicidas e fungicidas com câncer hematopoiético, de próstata, pâncreas, fígado, pulmão, ovário, mama, testículo, rim, cérebro e outros (Alavanja, Hoppin, Kamel, 2004; Kushik, Dharmani, 2005).

A sobrevivência de um indivíduo depende da estabilidade de seu genoma, que resulta não só de um mecanismo de transcrição preciso, mas também de mecanismos que reparam os danos que continuamente afetam o DNA (Alberts et al., 2002). Os genes XRCC1, XRCC3 e XPD são os principais genes responsáveis pelos mecanismos de reparo do DNA (Seedhouse, 2002)

O gene XRCC1 codifica uma das principais proteínas de reparo de DNA envolvidas no reparo de excisão de bases (BER). Sua transcrição é iniciada quando ocorre exposição a radiação ionizante ou agentes alquilantes e

possíveis danos causados por espécies reativas a oxigênio (ROS- "Reactive oxygen species") possibilitando um reparo eficiente do DNA (Hu et al., 2005; Berra, Menck, 2006).

O gene do xeroderma pigmentoso (XP), por sua vez, está envolvido com o reparo por excisão de nucleotídeos (NER). Este tipo de reparo é uma das melhores formas de remover lesões no DNA, principalmente aquelas induzidas pelo cigarro, fotoprodutos produzidos por UV e produtos químicos. A atividade do XPD é essencial para a vida, sendo que a total ausência deste gene resulta em letalidade embrionária (Friedberg, 2004).

Os polimorfismos em genes de reparo de DNA podem afetar a função das proteínas e a capacidade individual de reparar danos no DNA, levando a uma instabilidade genética e a alguns tipos de cânceres como glioma, câncer de bexiga, mama, esôfago, pulmão, próstata, pele, cabeça, pescoço e estômago. Estudos sobre a relação entre polimorfismos em genes de reparo de DNA e câncer têm apresentado resultados não significativos para alguns genes (Lee et al., 2002; Tae et al., 2004, ; Deligezer, Dalay, 2004; Hu et al., 2005; Lopez et al., 2007 ; Deligezer, Uki-sik, Dalay, 2007,). No entanto, a análise de múltiplos genes pode ajudar a esclarecer a associação do câncer com tais polimorfismos e capacidade de reparo do DNA (Goode, Ulrich, Potter, 2002,).

Considerando que (i) a utilização de agrotóxicos para controle de pragas nas lavouras é um fato inegável; (ii) os cuidados com o seu manuseio são frequentemente negligenciados e (iii) polimorfismos em genes de reparo podem favorecer o desenvolvimento do câncer, o presente trabalho teve como objetivo analisar a presença dos polimorfismos Arg399Gln do gene XRCC1 e Lys751Gln do

gene XPD em trabalhadores rurais expostos aos agrotóxicos de três municípios do interior do estado de São Paulo (Bauru, Braúna e Itajobí) e em indivíduos não expostos aos agrotóxicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Sagrado Coração – USC (processo número 115/06 e 116/06). A participação dos indivíduos na pesquisa foi iniciada após o preenchimento e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Os dados pessoais dos sujeitos da pesquisa, assim como os referentes à exposição a agrotóxicos, foram coletados através da aplicação de questionário.

Este estudo transversal foi realizado em 30 indivíduos do sexo masculino expostos a agrotóxicos e 15 indivíduos não expostos, também do sexo masculino, e escolhidos, de acordo com a idade (variação de mais ou menos dois anos em relação ao grupo exposto), seguindo os mesmos procedimentos de coleta e entrevista.

De cada indivíduo foram coletados cinco mililitros de sangue periférico em seringas descartáveis. Em todas as amostras sanguíneas foi realizada a lise de glóbulos vermelhos para posterior extração de DNA genômico utilizando cloreto de sódio 5M e álcool etílico. Para verificar a qualidade das amostras, foram realizadas eletroforese em gel de agarose 1% e quantificação por espectrofotometria (260 nm). As amostras foram diluídas até uma concentração de 10ng/μl, para uso posterior nas reações de amplificação.

A reação de amplificação do gene XRCC1 foi realizada utilizando: primer forward 5'- CAAGTACAGCCAGGTCCTAG -3' e primer reverse 5'- CCTCCCTCATCTGGAGTAC -3'. A ciclagem programada teve uma desnaturação inicial de 95°C por dois minutos, seguida de 35 ciclos: desnaturação a 94°C por 15

segundos, anelamento por 45 segundos a 57°C, extensão por 45 segundos a 72°C e finalmente extensão final por cinco minutos a 72°C (Au, Salama, Sierra-Torres, 2003).

A amplificação do gene XPD, também foi realizada utilizando: primer forward 5'-CTGCTCAGCCTGGAGCAGCTAGA-ATCAGAGGACGCTG- 3' e primer reverse 5'-AAGACCTTAG-CACCACCG-3'. A ciclagem programada teve desnaturação inicial de 95°C por dois minutos, seguida de 40 ciclos: 94°C por 15 segundos, 67°C por 30 segundos e 72°C por 45 segundos, seguidos de uma extensão final a 72°C por cinco minutos (Au, Salama, Sierra-Torres, 2003).

A confirmação da amplificação do fragmento gênico foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1%.

Após a realização da amplificação através da reação em cadeia da polimerase (PCR), foi realizada a digestão enzimática dos fragmentos amplificados para genotipagem (Restriction Fragment Length Polymorphism-Polimerase Chain – RFLP-PCR) do polimorfismo do gene XRCC1 (Arg399Gln), utilizando a enzima Nci I (Promega®) e do gene XPD (Lys751Gln), utilizando a enzima Pst I (Promega®). Os fragmentos gerados foram verificados através da eletroforese em gel de poliacrilamida 6%. Para verificação da existência de diferença significativa entre os resultados obtidos nos indivíduos expostos e não expostos, foi aplicado o teste de qui-quadrado considerando o limite mínimo de significância de 95% ($p < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A caracterização da população estudada, bem como os tipos de agrotóxicos usados na lavoura, está demonstrada nas **Tabelas 1 e 2**. É importante ressaltar que após avaliação da média da idade e do tempo de exposição aos agrotóxicos, foi notado que esses indivíduos passaram mais da metade da vida em contato com esses agentes químicos (**Tabela 1**).

Tabela 1. Dados referentes a população estudada.

| | Indivíduos não expostos (n=15) | Indivíduos expostos (n=30) | Valor p |
|----------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|---------|
| | m (dp) | m (dp) | |
| Idade (anos) | 47,33 (11,29) | 45,7 (10,20) | 0,321 |
| Tempo de exposição* (anos) | 0 (0) n (%) | 24,5 (14,39) n (%) | < 0,05 |
| Branco | 7 (46,66) | 10 (33,33) | 0,213 |
| Pardos | 6 (40) | 15 (50) | 0,080 |
| Negros | 2 (13,34) | 5 (16,67) | 0,324 |
| Amarelos | 0 (0) | 0 (0) | |

m= média; dp=desvio padrão; * tempo de exposição aos agrotóxicos.

Tabela 2. Agrotóxicos utilizados pelos indivíduos expostos. Classificação dos agrotóxicos de acordo com Lei Federal 7802 de 11/07/89

| Classificação dos agrotóxicos quanto à sua ação e grupo químicos | n (%) de indivíduos que usam ou já usaram esse tipo de agrotóxico |
|--|---|
| <i>Inseticidas:</i> | |
| Organofosforados | 25 (83,33) |
| Carbonatos | 13 (43,33) |
| Organoclorados | 9 (30) |
| Piretróides | 5 (16,66) |
| <i>Fungicidas:</i> | |
| Etileno-bis-ditiocarbonatos | 6 (20) |
| Trifenil estânico | 2 (6,6) |
| Captan | 4 (13,33) |
| Hexaclorobenzeno | 4 (13,33) |
| <i>Herbicidas:</i> | |
| Paraguat | 6 (20) |
| Glifosato | 30 (100) |
| Pentacloroofenol | 5 (16,66) |
| Derivados do ácido fenoxiacético | 20 (66,66) |
| Dinitrofenóis | 19 (63,33) |
| <i>Raticidas</i> | 15 (50) |
| <i>Acaricidas</i> | 25 (83,33) |
| <i>Nematicidas</i> | 27 (90) |
| <i>Molusquicidas</i> | 15 (50) |
| <i>Fungigantes</i> | 28 (93,33) |

Através da genotipagem do fragmento do gene XRCC1 399, foi possível verificar que o genótipo selvagem (Arg/Arg) foi encontrado em 33,33% dos indivíduos expostos e em 20% dos não expostos. O genótipo heterozigoto para a mutação (Arg/Gln) foi encontrado em 50% dos indivíduos expostos e em 73,33% dos não expostos e o genótipo homozigoto para mutação (Gln/Gln) foi encontrado em 16,66% dos indivíduos expostos e em 6,66% dos não expostos (**Figura 1**). Após a análise estatística observamos que a distribuição dos genótipos não diferenciou os grupos estudados ($p = 0,3154$; $\chi^2 = 2,31$).

Com a genotipagem do fragmento do gene XPD 751, foi verificada a presença do genótipo selvagem (Lys/Lys) em 43,3% dos indivíduos expostos e em 40,0% dos não expostos. O genótipo heterozigoto para a mutação (Lys/Gln) foi encontrado em 50,0% dos indivíduos expostos e em 53,3% dos não expostos, e o genótipo homozigoto para mutação (Gln/Gln) foi encontrado em 6,7% dos indivíduos expostos e em 6,7% dos não expostos (**Figura 2**). Após a análise estatística observamos que a distribuição

Figura 1. Presença dos genótipos (Arg/Gln, Arg/Arg e Gln/Gln)- gene XRCC1 nos grupos de indivíduos não expostos e expostos aos agrotóxicos.

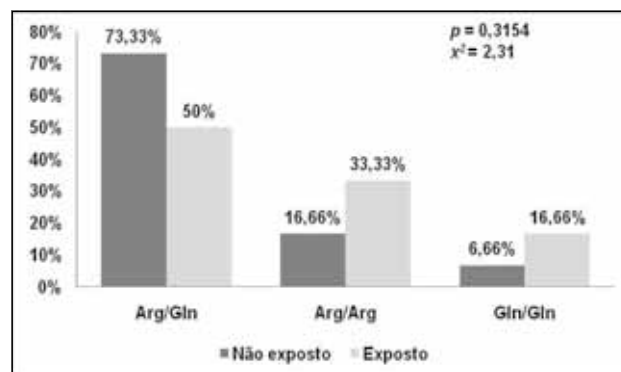
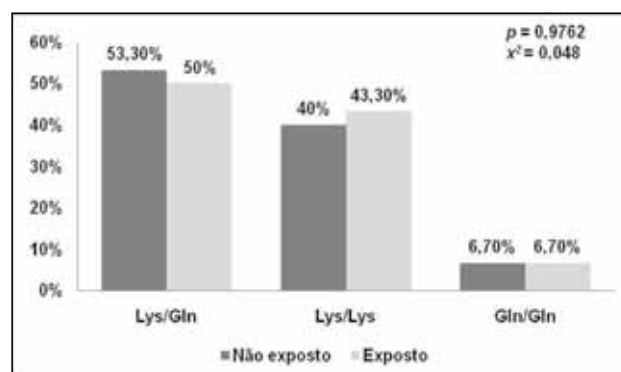


Figura 2. Presença dos genótipos (Lys/Gln, Lys/Lys e Gln/Gln)- gene XPD nos grupos de indivíduos não expostos e expostos aos agrotóxicos.



dos genótipos também não diferenciou os grupos estudados ($p = 0,9762$; $\chi^2 = 0,048$).

Dentre os indivíduos expostos, observou-se que 30% deles eram heterozigotos para a mutação em ambos os genes (XPD Lys751Gln e XRCC1 Arg399Gln). No grupo de não expostos, 40% também apresentaram esse genótipo para ambos os genes.

DISCUSSÃO

O Brasil está entre os principais consumidores mundiais de agrotóxicos. A maior utilização dessas substâncias é na agricultura, especialmente nos sistemas de monocultura, em grandes extensões, porém os cuidados com o seu manuseio continuam sendo frequentemente negligenciados pelos aplicadores (Paumgarten, 1998). Nossos dados

demonstram que os trabalhadores rurais passam grande parte de suas vidas na lavoura em contato com diferentes substâncias químicas.

Substâncias químicas podem danificar a molécula de DNA e estes danos devem ser reparados pelos genes de reparo de DNA, que agem por diversas vias. Os polimorfismos em genes de reparo do DNA podem levar a uma falha nesses mecanismos, aumentando o risco para o aparecimento de câncer (Berra, Menck 2006).

Em nosso estudo, a presença do genótipo mutado nos genes estudados foi marcante nos dois grupos. Além disso, 30% dos expostos e 40% dos não expostos apresentaram o genótipo heterozigoto para a mutação em ambos os genes de reparo estudados, levando assim a uma necessidade do monitoramento molecular do grupo exposto, já que além do genótipo mutado esses indivíduos sofrem a exposição a várias classes de agrotóxicos durante vários anos, e essa exposição pode aumentar o risco de desenvolver câncer.

Vários estudos confirmam a relação entre os polimorfismos estudados e o desenvolvimento de alguns tipos de cânceres.

O polimorfismo Arg399Gln do gene XRCC1 foi relacionado com a suscetibilidade para desenvolver alguns tipos de cânceres (Kelsey et al., 2004). Outra relação foi encontrada por Xing et al. (2002), que sugeriram uma associação entre o aumento do risco de desenvolvimento de carcinoma de células escamosas do esôfago e polimorfismos no XRCC1, em um estudo com a população coreana envolvendo o gene XRCC1 (Arg194Trp e Arg399Gln) e o gene XPD (Asp312Asn e Lys751Gln).

O polimorfismo Lys751Gln do gene XPD tem sido associado ao câncer de pulmão, câncer colo-retal e melanoma (Duell et al., 2000; Tomescu et al., 2001; Palli et al., 2001; Spitz et al., 2001; Hou et al., 2002; Qiao et al., 2002; Tang et al., 2002; Matullo et al., 2003; Yeh et al., 2005). Brewster et al. (2004) relata que pelo menos uma cópia do alelo Gln do XPD aumenta o risco de desenvolvimento de cânceres secundários como o de próstata, pulmão e mama .

Os dados encontrados em nosso estudo revelam que, dos indivíduos expostos analisados, 30% apresentaram mutação tanto no gene XRCC1 (Arg399Gln), como no gene XPD (Lys751Gln). A investigação da frequência desses mesmos polimorfismos aqui estudados revelou que a associação entre eles é um fator importante para o aumento do risco de desenvolver câncer de pulmão (Zhou et al., 2003).

Outro estudos realizados na população brasileira também demonstram que os genótipos Arg/Gln do gene XRCC1 e Lys/Gln do gene XPD são comuns (Zhou, Elledge, 2000; Duarte et al., 2005; Dufloth et al., 2005; Canalle et al., 2006).

CONCLUSÕES

O achado de uma porcentagem elevada de mutações em indivíduos expostos e não expostos e o elevado tempo de exposição a agrotóxicos, requer outros estudos que envolvam a análise da instabilidade cromossômica para dar suporte aos resultados encontrados. Entretanto, fica evidente a importância do monitoramento molecular das populações expostas a mutagênicos, principalmente os trabalhadores rurais que são expostos a agrotóxicos por vários anos, e também a realização de um trabalho educativo relativo às noções de biossegurança aos trabalhadores rurais.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Sagrado Coração, USC, pela estrutura concedida para a realização deste trabalho. Ao suporte técnico de Wilson Orcine. E principalmente aos trabalhadores rurais de Bauru, Braúna e Itajobí.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALAVANJA, M. C.; HOPPIN, J. A.; KAMEL, F. Health effects of chronic pesticide exposure cancer and neurotoxicity. **Public Health**, v. 25, p. 155-197, 2004.
- ALBERTS, B. et al. **Molecular Biology of the Cell**. 4th edition, New York: Garland Science, 2002.
- AU, W.W.; SALAMA, S.A.; SIERRA-TORRES, C.H. Functional characterization of polymorphisms in DNA repair genes using cytogenetic challenge assays. **Environ. Health Perspect.**, v. 111, n. 15, p.1843-1850, 2003.
- BERRA, C. M.; MENCK, C. F. M. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. **Química Nova**, v.29, n. 6, p. 1340-1344, 2006.
- BOLOGNESI, C. Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. **Mutat. Res.**, v. 543, n. 3, p. 251-272, 2003.
- BREWSTER, A. H. et al. XPD polymorphism and risk of subsequent cancer in individuals with melanoma skin cancer. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.**, v. 13, n. 8, p. 1271-1275, 2004.
- CANALLE, R. et al. Polymorphisms in the thymidylate synthase promoter and the DNA repair genes XRCC1 and XPD in a Brazilian population. **Environ. Mol. Mutagen**, v. 47, n.9, p. 725-732, 2006.
- DELIGEZER, U.; AKISIK, E. E.; DALAY, N. Lack of association of XRCC1 codon 399 Gln polymorphism with chronic myelogenous leukemia. **Anticancer res.**, v. 27, p. 2453-2456, 2007.
- DELIGEZER, U.; DALAY, N. Association of the XRCC1 gene polymorphisms with cancer risk in Turkish breast cancer patients. **Exp. Mol. Med.**, v. 36, n. 6, p. 572-575, 2004.

- DUARTE, M. C. et al. Polymorphisms of the DNA repair genes XRCC1 e XRCC3 in Brazilian population. **Genetics and Molecular Biology**, v.28, n. 3, p. 397-401, 2005.
- DUCELL, E. J. et al. Polymorphisms in the DNA repair genes XRCC1 and ERCC2 and biomarkers of DNA damage in human blood mononuclear cells. **Carcinogenesis**, v. 21, n.5, p. 965-971, 2000.
- DUFLOTH, R.M. et al. DNA repair gene polymorphisms and susceptibility to familial breast cancer in a group of patients from Campinas, Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v.4, n.4, p. 771-782, 2005.
- FRIEDBERG, E.C. The discovery that xeroderma pigmentosum (XP) results from defective nucleotide excision repair. **DNA repair**, v.3, n.2, p. 183-195, 2004.
- GOODE, E. L.; Ulrich, C. M.; POTTER, J. D. Polymorphisms in DNA Repair Genes and Associations With Cancer Risk. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 11, n.12, p. 1513-1530, 2002.
- HOU, S.M. et al. The XPD variant alleles are associated with increased aromatic DNA adduct level and lung cancer risk. **Carcinogenesis**, v. 23, n.4, p.599-603, 2002.
- HU, Z. et al. A promoter polymorphism (-77T>C) of DNA repair gene XRCC1 is associated with risk of lung cancer in relation to tobacco smoking. **Pharmacogenet Genomics**, v. 15, n. 7, p. 457-463, 2005.
- KELSEY, K. T. et al. A population-based case-control study of the XRCC1 Arg399Gln polymorphism and susceptibility to bladder cancer. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, v. 13, n. 8, p. 1337-1341, 2004.
- KUSHIK, J.; DHARMANI, C. Epidemiology of Pesticide Exposure and Cancer: a Review. **Environ. Health.**, v. 20, n. 1, p. 15-38, 2005.
- LEE, S. G. et al. Genetic polymorphisms of XRCC1 and risk of gastric cancer. **Cancer Lett.**, v. 187. n.1-2, p. 53-60, 2002.
- LOPEZ, M. F. C. et al. Polymorphisms in XPC, XPD, XRCC1, and XRCC3 DNA repair genes and lung cancer risk in a population of Northern Spain. **BMC cancer**, v.16, p.162-199, 2007.
- MATULLO, G. et al. XRCC1, XRCC3, XPD gene polymorphisms, smoking and (32)P-DNA adducts in a sample of healthy subjects. **Carcinogenesis**, v. 22, n.9, p. 1437-1445, 2003.
- PALLI, D. et al. DNA adduct levels and DNA repair polymorphisms in traffic-exposed workers and a general population sample. **In. J. Cancer**, v. 94, n.1, p. 121-127, 2001.
- PAUMGARTTEN, F. R. et al. Levels of organochlorine pesticides in the blood serum of agricultural workers from Rio de Janeiro state, Brazil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 14, n. 3, p. 33-39, 1998.
- QIAO, Y. et al. Rapid assessment of repair of ultraviolet DNA damage with a modified host-cell reactivation assay using a luciferase reporter gene and correlation with polymorphisms of DNA repair genes in normal human lymphocytes. **Mutat. Res.**, v. 509, n.1-2, p. 165-174, 2002.
- SEEDHOUSE, C. et al. The genotype distribution of the XRCC1 gene indicates a role for base excision repair in the development of therapy-related acute myeloblastic leukemia. **Blood**, v. 100, n. 10, p. 3761-3766, 2002.
- SPITZ, M.R. et al. Modulation of nucleotide excision repair capacity by XPD polymorphisms in lung cancer patients. **Cancer Res**, v. 61, n.4, p. 1354-1357, 2001.
- TAE, K. et al. Association of DNA repair gene XRCC1 polymorphisms with head and neck cancer in Korean population. **Int. J. Cancer**, v. 11, n. 5, p. 805-808, 2004.
- TANG, D. et al. Polymorphisms in the DNA repair enzyme XPD are associated with increased levels of PAH-DNA adducts in a case-control study of breast cancer. **Breast Cancer Res. Treat.**, v. 75, n.2, p. 159-166, 2002.
- TOMESCU, T. et al. Nucleotide excision repair gene XPD polymorphisms and genetic predisposition to melanoma. **Carcinogenesis**, v. 22, n. 3, p. 403-408, 2001.
- XING, D. et al. Polymorphisms of DNA repair genes XRCC1 and XPD and their associations with risk of esophageal squamous cell carcinoma in a Chinese population. **Int. J. Cancer**, v. 100, n. 5, p. 600-605, 2002.
- ZHOU, B.B.; Elledge, S.J. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. **Nature**, v. 498, n. 6811, p. 433-439, 2000.
- ZHOU, W. et al. Polymorphisms in the DNA repair genes XRCC1 and ERCC2, smoking, and lung cancer risk. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, v. 12, n. 4, p. 359-365, 2003.
- YEH, C. C. et al. Polymorphisms of the XRCC1, XRCC3, & XPD genes, and colorectal cancer risk: a case-control study in Taiwan. **BMC Cancer**, v. 5, n. 12, 2005.