

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**"JULIO DE MESQUITA FILHO"**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
**CÂMPUS DE ARARAQUARA**

**ANÁLISE DA MUTAGENICIDADE URINÁRIA E**  
**SUSCEPTIBILIDADE GENÉTICA NO MONITORAMENTO**  
**DE INDIVÍDUOS EXPOSTOS A SOLVENTES ORGÂNICOS**

**SORAYA DUARTE VARELLA**

**ORIENTADORA: Profa. Dra. Eliana Aparecida Varanda**

**ARARAQUARA - SP**

**2005**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**"JULIO DE MESQUITA FILHO"**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
**CÂMPUS DE ARARAQUARA**

**ANÁLISE DA MUTAGENICIDADE URINÁRIA E**  
**SUSCEPTIBILIDADE GENÉTICA NO MONITORAMENTO**  
**DE INDIVÍDUOS EXPOSTOS A SOLVENTES ORGÂNICOS**

**SORAYA DUARTE VARELLA**

**TESE PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM ANÁLISES CLÍNICAS,**  
**ÁREA DE ANÁLISES CLÍNICAS.**

**ORIENTADORA: Profa. Dra. Eliana Aparecida Varanda**

**ARARAQUARA - SP**

**2005**

### **Ficha Catalográfica**

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
UNESP – Campus de Araraquara

V293a Varella, Soraya Duarte  
Análise da mutagenicidade urinária e susceptibilidade genética no monitoramento de indivíduos expostos a solventes orgânicos. / Soraya Duarte Varella . – Araraquara, 2005.  
98 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Análises Clínicas

Orientador: Eliana Aparecida Varanda

1.Mutagenicidade urinária. 2.Polimorfismo enzimático. 3.Exposição ocupacional. 4.Teste de Arnês. I.Varanda, Eliana Aparecida, orient. II. Título.

**CDD: 616.-07566**

**CAPES:40300005**

## **TERMO DE APROVAÇÃO**

AUTOR: Soraya Duarte Varella

TÍTULO DO TRABALHO: Análise da mutagenicidade urinária e susceptibilidade genética no monitoramento de indivíduos expostos a solventes orgânicos.

TESE PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR

PRESIDENTE E ORIENTADORA: Profa. Dra. Eliana Aparecida Varanda

INSTITUIÇÃO: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara -UNESP

PRIMEIRO EXAMINADOR: Profa. Dra. Denise Crispin Tavares

INSTITUIÇÃO: Universidade de Franca

SEGUNDO EXAMINADOR: Profa. Dra. Lusânia Maria Greggi Antunes

INSTITUIÇÃO: Universidade de Medicina do Triângulo Mineiro

TERCEIRO EXAMINADOR: Profa. Dra. Ilce Mara de Syllos Cólus

INSTITUIÇÃO: Universidade Estadual de Londrina

QUARTO EXAMINADOR: Profa. Dra. Christiane Pienna Soares

INSTITUIÇÃO: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara -UNESP

ARARAQUARA, 04 de outubro de 2005.

A Profa. Dra. Eliana Aparecida Varanda –  
Grande mulher, grande pesquisadora, mestra autêntica.

---

## AGRADECIMENTOS

“O que somos e o que criamos é o resultado da interação entre nossos genes e o meio ambiente. Nesse sentido, gostaria de expressar minha gratidão àqueles que passaram seus genes”, Carlos e Marilda e ao meu avô Euclides. Agradeço também aos meus irmãos Alexandre, Luciano, Daniel e Neto, que colaboraram, criando um ambiente favorável para a realização desse trabalho.

Gostaria também de registrar aqui meus agradecimentos especiais para:

Dra. Clarice Queico Fujimura, Ana Carolina Malaspina e Karina Andrade Prince pela disponibilidade, paciência e ensinamentos.

Dra. Ilce Mara Syllos Cólus e Dra. Regislaine Burim, pela prestatividade.

Dr. Wagner Vilegas, Roberta Coelho, Marcelo Telascrea e Marcelo Silva, pelo apoio na fase inicial desse trabalho.

Dra. Raquel Moreira, Dra. Tais Bauab, Dr. Sandro Valentin, pelos equipamentos e Luis Eduardo dos Santos, pelo valioso auxílio.

Valéria Aparecida de Araújo Mallavolta , Walclécio Lira e Cássia Regina Cardoso pela ajuda fundamental na coleta de sangue.

Dra. Mara Pinto e aos alunos da 73° Turma de Farmácia e Bioquímica Noturno, pelo carinho e atenção.

César Terçariol pela colaboração na avaliação dos resultados (análises estatísticas).

Toda equipe do laboratório de mutagênese: Ana Paula de Oliveira, Cássia Regina Cardoso, Fabiana I. Biso, Fábio Vieira dos Santos, Flávio Romanini Tubaldini, Maira

Eiko. I. Nogueira, Mariana H. Passoni, Walclécio Lira. Especialmente a Raquel Aparecida Rampazo, que dividiu essa pesquisa comigo.

Ednéia Fátima Corrêa, Marisa Fernandes e Silvia Helena de Oliveira David, pelo respaldo técnico, e pela amizade.

Ivone Shisuko Anno e Mirna Fernanda de Oliveira, amigas para todas as horas.

Claúdia Lúcia Molina, Laura Rosim e Sônia Ornellas Silva, funcionárias do setor de pós-graduação

Aparecida Bernadete Rocateli Jesus e a todos os outros funcionários e professores da FCFAR que colaboraram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho.

Todos os voluntários que participaram dessa pesquisa.

Centro Universitário Barão de Mauá, especialmente a Dra. Joyce Gabrielli, Dra. Tokico Murakawa Moryia e Maria Zuanon.

CAPES pelo apoio financeiro.

Se as coisas são inatingíveis...ora

Não é motivo para não querê-las...

Que triste o caminho, se não fora à mágica presença das estrelas.

Mário Quintana.

---



## RESUMO

A exposição ocupacional a solventes orgânicos é um sério problema para milhares de trabalhadores. A literatura demonstra a ocorrência de um elevado risco de danos no material genético desses indivíduos, no entanto, os efeitos da mistura dos solventes orgânicos não são bem conhecidos. As diferenças genéticas (polimorfismos enzimáticos) também têm um importante papel na capacidade de ativação e de detoxificação de xenobióticos, incluindo os solventes orgânicos. As mutações causadas por agentes ambientais associadas aos diferentes genótipos, são fatores relacionados ao desenvolvimento de neoplasias e outras doenças degenerativas. O ensaio de mutagenicidade urinária indica a ocorrência de possíveis lesões pré-clínicas enquanto que a determinação dos polimorfismos enzimáticos mostra um perfil genético de risco. Assim, os profissionais da saúde envolvidos com a qualidade de vida do trabalhador, podem ter subsídios para o controle da exposição ocupacional e conseqüentemente evitar o aparecimento de doença (lesão clínica), principalmente o câncer. O trabalho diário num laboratório de pesquisa onde são utilizados vários tipos de solventes é igualmente preocupante. Diante disso, este estudo teve os seguintes objetivos: caracterizar a atividade mutagênica na urina de 30 indivíduos ocupacionalmente expostos a solventes orgânicos e indivíduos sem essa exposição (controles); identificar o polimorfismo constitucional desses indivíduos para os genes *GSTM1*, *GSTT1* e *CYP2E1*; e tentar correlacionar a influência desses genótipos com a atividade mutagênica urinária. A coleta da urina foi realizada em frascos de polietileno durante o dia de trabalho, até a obtenção de aproximadamente 1000mL. Para a concentração e extração dos compostos presentes na urina foi usada a resina XAD-2 e o solvente acetona. Diferentes concentrações (1,5; 3,0; 6,0 e 12,0 mL equivalente de urina/placa) de cada amostra foram avaliadas através do teste de Ames, com e sem ativação metabólica, usando as linhagens TA100 e YG1024. A partir do sangue total coletado de cada indivíduo, foi extraído o DNA e foi utilizada a técnica de PCR para a amplificação dos polimorfismos dos genes *GSTM1*, *GSTT1* e *CYP2E1-PstI*. Os resultados da avaliação da atividade mutagênica das amostras de urina do grupo exposto apresentaram aumento estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) na linhagem YG1024, com metabolização quando comparado com os resultados encontrados no grupo controle. Observou-se a influência (sem significância estatística) do genótipo *GSTM1/GSTT1* nulo na resposta mutagênica do grupo exposto. Das 7 amostras de urina com mutagenicidade positiva, 6 eram de indivíduos com genótipo *GSTM1/GSTT1* nulo e, apenas 1 amostra era de um indivíduo com *GSTM1* presente. Com isso, fica clara a relevância dos estudos que avaliam o risco de exposição ocupacional a solventes orgânicos, através do uso de biomarcadores biológicos e perfis genéticos e, assim promover medidas que resguardem a saúde desses trabalhadores.

**Palavras-chave:** mutagenicidade urinária; polimorfismo enzimático; exposição ocupacional; teste de Ames.

## ABSTRACT

The occupational exposure to organic solvents is a serious problem to millions of workers. The reports shows a high risk of genetic damage on these workers. However, the effects of mixtures of solvents are not well known. The genetic differences (enzimatic polymorphisms) are very important for the capacity of activating and detoxifying carcinogens, such as organic solvents. Mutations caused by environmental agents associated with the different genotypes are related to cancer development and other degenerative diseases. The urinary mutagenicity assay shows pre-clinical damages while the enzymatic polymorphisms show a genetic risk profile. In this way, the health professionals can have subsity to occupational exposure control in order to avoid disease development (clinical damage), cancer especially. The work in a research laboratory that uses several types of solvents is equally preoccupating. In this way, in this study the genotyping approach was used to study the influence of the metabolic polymorphisms *CYP2E1*, *GSTM1* and *GSTT1* on urinary mutagenicity, detected with *Salmonella*/microsome assay, in 30 subjects exposed to solvents, and 30 subjects without occupational exposure (controls). Urine samples were collected in polyethylene containers at the end of the work shift. For the concentration and extraction of urine samples was used the XAD-2 resin and acetone as eluting agent. Different doses of extract (1.5; 3.0; 6.0 and 12.0 mL equivalents per plate) were tested on *Salmonella typhimurium* strains TA100 and YG1024, with and without metabolic activation. Genomic DNA was extracted from blood and the *GSTM1*, *GSTT1* and *CYP2E1-PstI* genotypes were deternined using a PCR method. The mutagenic activity of urine samples from exposed workers shows a significant difference ( $p \leq 0.05$ ) when compared to those in the control group in the *Salmonella typhimurium* YG1024 with S9 mix. The genotype *GSTM1/GSTT1* null influenced (not statistical significance) in mutagenic activity from exposed group. Among the 7 urine samples with positive mutagenicity, 6 were from volunteers with *GSTM1/GSTT1* null genotype and just 1 was from volunteers with *GSTM1* present genotype. These studies show the relevance of assessing the risk of occupational exposure to organic solvents, with the use of biological biomarkers and genetic profiles and to promote ways for protecting the health of the workers.

**Keywords:** urinary mutagenicity; enzymatic polymorphism; occupational exposure; Ames test

## SUMÁRIO

<b>1.INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1- Exposição ocupacional, mutagenicidade urinária e efeitos adversos à saúde.....	2
1.2- Importância dos polimorfismos genéticos ( <i>GSTM1</i> , <i>GSTT1</i> e <i>CYP2E1</i> ) nos efeitos adversos à saúde, advindos da exposição a xenobióticos.....	6
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	12
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	13
3.1- Amostras de urina.....	13
3.2- Avaliação da mutagenicidade urinária.....	15
3.2.1- Ensaio de mutação gênica reversa.....	15
3.2.2- Linhagens de <i>Salmonella typhimurium</i> .....	15
3.2.3- Meios de cultura.....	16
3.2.4- Manutenção e estoque das culturas.....	17
3.2.5- Confirmação dos genótipos das linhagens de <i>Salmonella typhimurium</i> .....	17
3.2.6- Sistema de ativação metabólica.....	19
3.2.7- Procedimento do ensaio de acordo com Maron e Ames (1983).....	19
3.2.8- Controles.....	20
3.3- Estudo dos polimorfismos enzimáticos.....	21
3.3.1- Extração e quantificação do DNA genômico.....	21
3.3.2- Amplificação das seqüências de DNA e detecção dos genótipos.....	21
3.3.3- Detecção dos genótipos <i>GSTM1</i> e <i>GSTT1</i> por PCR- multiplex.....	22
3.3.4- Detecção do genótipo <i>CYP2E1</i> – <i>PstI</i> .....	23
<b>4. AVALIAÇÃO E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS</b> .....	24
<b>5. RESULTADOS</b> .....	26
5.1- Caracterização das amostras estudadas.....	26
5.2- Atividade mutagênica dos extratos orgânicos de urina.....	29
5.3- Distribuição das freqüências dos diferentes polimorfismos estudados.....	48
5.4- Caracterização dos indivíduos analisados em relação a diferentes parâmetros.....	49
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	55
6.1- Análise da mutagenicidade urinária.....	55

6.2- Análise dos polimorfismos das enzimas de metabolização de xenobióticos e, sua influência nos danos ao material genético.....	59
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>67</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>69</b>
<b>ANEXOS</b>	
Questionário.....	88
Termo de Consentimento .....	96
Parecer do Comitê de Ética.....	98

## Lista de tabelas

<b>Tabela 1:</b> Descrição comparativa das linhagens bacterianas.....	16
<b>Tabela 2:</b> Caracterização dos indivíduos dos grupos, controle e exposto, em relação ao sexo, grupo étnico e idade .....	26
<b>Tabela 3:</b> Caracterização dos indivíduos, através da frequência, segundo o consumo de vegetais, consumo de bebidas alcoólicas, uso de medicamentos e tempo de exposição a solventes orgânicos.....	28
<b>Tabela 4:</b> Atividade mutagênica expressa pela média (M) e desvio padrão (SD) do número de revertentes/placa e razão de mutagenicidade (RM) dos extratos orgânicos de urina do grupo controle (C), nas diferentes doses, utilizando-se as linhagens TA100 e YG1024 tanto na presença (+S9) quanto na ausência (-S9) de ativação metabólica.....	33
<b>Tabela 5:</b> Atividade mutagênica expressa pela média (M) e desvio padrão (SD) do número de revertentes/placa e razão de mutagenicidade (RM) dos extratos orgânicos de urina do grupo exposto (E), nas diferentes doses, utilizando-se as linhagens TA100 e YG1024 tanto na presença (+S9) quanto na ausência (-S9) de ativação metabólica.....	37
<b>Tabela 6:</b> Atividade mutagênica expressa em potência (número de revertentes his+/mLequivalente urina), das amostras do grupo controle e exposto, com resposta mutagênica positiva em pelo menos um dos ensaios (TA100 ou YG1024, com (+S9) ou sem (-S9) ativação metabólica).....	41
<b>Tabela 7:</b> Atividade mutagênica expressa pelo maior valor da razão de mutagenicidade (RM) nas amostras do grupo controle e exposto, nas linhagens TA100 e YG1024, com (+S9) e sem (-S9) ativação metabólica.....	42
<b>Tabela 8:</b> Atividade mutagênica expressa pelo índice de aumento relativo no número de revertentes his+, das amostras do grupo controle e exposto, nas linhagens TA100 e YG1024, com (+S9) e sem (-S9) ativação metabólica.....	43
<b>Tabela 9:</b> Caracterização das amostras dos indivíduos dos grupos, controle e exposto, em relação à idade, sexo, grupo étnico, atividade mutagênica da urina e polimorfismos dos genes <i>CYP2E1</i> , <i>GSTT1</i> e <i>GSTM1</i> .....	51
<b>Tabela 10:</b> Caracterização das amostras dos indivíduos dos grupos, controle e exposto, em relação à idade, sexo e atividade mutagênica (diferentes parâmetros de avaliação) daurina e polimorfismos dos genes <i>CYP2E1</i> , <i>GSTT1</i> e <i>GSTM1</i> .....	53

## Lista de figuras

<b>Figura 1:</b> Fases da intoxicação.....	3
<b>Figura 2:</b> Razão de mutagenicidade (RM) das amostras de urina do controle (A) e exposto (B), na linhagem de <i>S. typhimurium</i> TA100 sem ativação metabólica.* amostras com atividade mutagênica positiva.....	44
<b>Figura 3:</b> Razão de mutagenicidade (RM) das amostras de urina do controle (A) e exposto (B), na linhagem de <i>S. typhimurium</i> TA100 com ativação metabólica.....	45
<b>Figura 4:</b> Razão de mutagenicidade (RM) das amostras de urina do controle (A) e exposto (B), na linhagem de <i>S. typhimurium</i> YG1024 sem ativação metabólica.* amostras com atividade mutagênica positiva.....	46
<b>Figura 5:</b> Razão de mutagenicidade (RM) das amostras de urina do controle (A) e exposto (B), na linhagem de <i>S. typhimurium</i> YG1024 com ativação metabólica.* amostras com atividade mutagênica positiva.....	47
<b>Figura 6:</b> PCR multiplex para a detecção de alelos homozigotos nulos das glutathione S-transferases M1 ( <i>GSTM1</i> ) e T1 ( <i>GSTT1</i> ).....	48
<b>Figura 7:</b> PCR - RFLP para detecção do polimorfismo <i>CYP2E1</i> –PstI.....	49
<b>Figura 8:</b> Média e desvio padrão dos índices de aumento relativo no número de revertentes his+, das amostras de urina dos indivíduos com genótipo <i>GSTM1/GSTT1</i> nulo, no grupo controle (A) e no exposto (B).....	54

## **Lista de abreviaturas**

CYPs, citocromo P450

*CYP2E1*, citocromo P450

DMSO, dimetilsulfato

GSTs, glutationa S-transferases

*GSTM1*, glutationa S-transferase M1

*GSTT1*, glutationa S-transferase T1

HPAs, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

NATs, N-acetiltransferases

## 1. Introdução

A exposição ocupacional diária a uma grande variedade de compostos químicos em baixas concentrações, tem levado a efeitos crônicos na saúde do trabalhador, com sérias conseqüências toxicológicas, sendo a causa de inúmeras doenças, inclusive o câncer.

A maioria das pessoas tem sido expostas a algum tipo de solvente no seu trabalho. Embora, na última década, os níveis de exposição tenham diminuído muito em países industrializados, o número de trabalhadores expostos a solventes ainda é grande (FECHNER *et al.*, 2001; JOO *et al.*, 2004; HEUSER *et al.*, 2005).

Diferenças individuais quanto ao risco de desenvolver câncer são provenientes, entre outros fatores, da capacidade geneticamente determinada do organismo em ativar ou detoxificar os carcinógenos. Assim sendo, a associação entre alelos específicos de genes responsáveis pela metabolização de compostos químicos e o risco aumentado ao desenvolvimento de tumores, se deve à existência de múltiplos passos enzimáticos no metabolismo, que podem resultar na ativação ou detoxificação de xenobióticos. A ativação de pró-carcinógenos é um evento fundamental para que os compostos ambientais possam interagir com o DNA. De um modo geral, mas não absoluto, a formação de agentes eletrofílicos a partir de



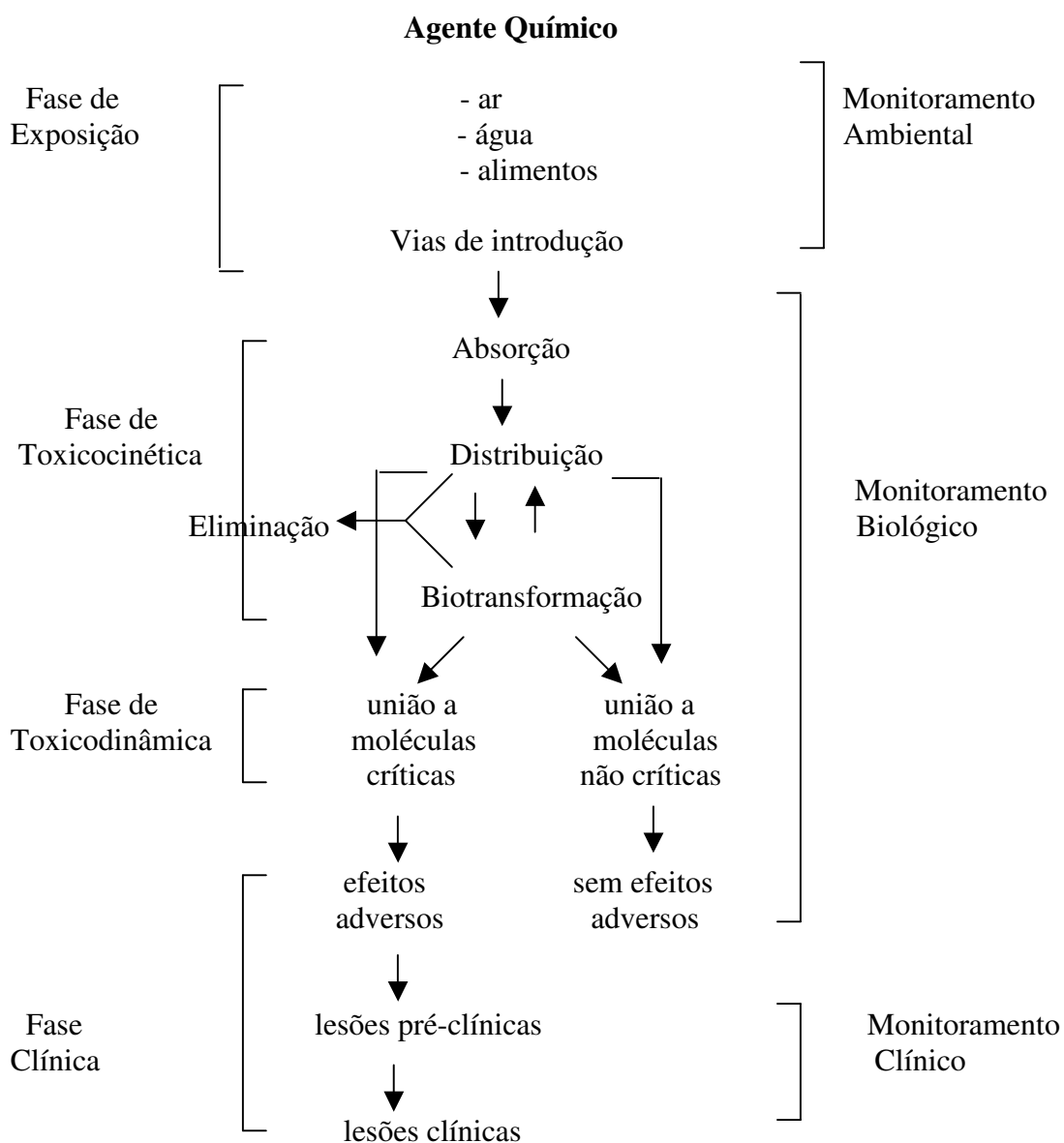
carcinógenos ambientais são catalisadas pelas enzimas do citocromo P450 (*CYPs*) e neutralizadas pelas glutathione S-transferases (*GSTs*), (RIBEIRO *et al.*, 2003).

Os fatores genéticos e ambientais são importantes determinantes, além de responsáveis pelas significativas variações individuais no desenvolvimento de doenças. A combinação do conhecimento acerca dos fatores externos relacionados ao hábito de vida e ambiente, acrescidos do minucioso entendimento de como diferenças genéticas podem causar variações nas respostas do homem aos poluentes ambientais, possibilita o esclarecimento dos mecanismos de desenvolvimento do câncer.

### **1.1. Exposição ocupacional, mutagenicidade urinária e efeitos adversos à saúde**

A má qualidade do ar do ambiente de trabalho é um fator importante para o desencadeamento do câncer ocupacional. Durante pelo menos oito horas por dia os trabalhadores estão expostos ao ar poluído, colocando seriamente em risco sua saúde. Algumas substâncias como asbestos, encontrados em materiais como fibras de amianto ou cimento, as aminas aromáticas, usadas na produção de tintas e os agrotóxicos agem preferencialmente sobre a bexiga, enquanto os hidrocarbonetos aromáticos, encontrados na fuligem, parecem agir sobre as células da pele, sobre as vias respiratórias e pulmões (KLAASSEN, 2001).

Uma série de processos complexos que envolvem o agente químico e o organismo resultam na manifestação do efeito tóxico. O entendimento dos mecanismos responsáveis por essas manifestações só é possível através da compreensão dos processos bioquímicos. Portanto, é fundamental o conhecimento das fases que antecedem o aparecimento dos efeitos tóxicos, que são, a fase de exposição, a fase de toxicocinética e a fase de toxicodinâmica (Figura 1).



**Figura 1:** Fases da intoxicação (KLAASSEN, 2001, modificado).

A fase de exposição corresponde à presença dessas substâncias químicas no ambiente de trabalho, que podem introduzir-se principalmente pela via respiratória. A fase de toxicocinética corresponde à absorção, distribuição, biotransformação, acúmulo e eliminação do agente químico. A substância química, uma vez absorvida pelo organismo, interage com moléculas específicas provocando desde desequilíbrios leves até morte, caracterizando assim a

fase de toxicodinâmica. A fase clínica corresponde ao aparecimento de sinais e sintomas que caracterizam os efeitos tóxicos e evidenciam a presença do fenômeno de intoxicação.

Ocorrendo a exposição, o agente químico poderá introduzir-se no organismo através de uma ou mais vias, como a respiratória, cutânea ou digestiva. A via respiratória é a principal via de introdução dos agentes químicos no organismo humano, pois os estados físicos dos agentes químicos mais comumente encontrados no ambiente de trabalho são gases, vapores e partículas. O contato constante do sistema respiratório, que é permeável e ricamente vascularizado com o ambiente externo, permite geralmente uma absorção rápida e eficiente, fazendo com que o agente químico muitas vezes alcance outros centros vitais, como Sistema Nervoso Central e outros órgãos, sem passar pelo sistema hepático (KLAASSEN, 2001).

O câncer provocado por exposições ocupacionais geralmente atinge regiões do corpo que estão em contato direto com as substâncias carcinogênicas, seja durante a fase de absorção (pele e aparelho respiratório) ou de excreção (aparelho urinário), o que explica a maior frequência de câncer de pulmão (LEE *et al.*, 2003), de pele (FATIMA *et al.*, 2000) e de bexiga (PESCH *et al.*, 2000) nesse tipo de exposição.

É bem documentado que mutações gênicas atuam em etapas do processo de carcinogênese e, que ensaios que detectam componentes genotóxicos permitem identificar substâncias com risco potencial à saúde humana. O teste de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium*, também conhecido como *Salmonella*/microsomo, ou Teste de Ames, é a metodologia de triagem mais utilizada atualmente para detectar substâncias genotóxicas, sendo validado em larga escala por diversos laboratórios (MORTELMANS & ZEIGER, 2000; RIBEIRO *et al.*, 2003; VARELLA *et al.*, 2004a). O teste de mutação gênica reversa em *Salmonella typhimurium* (teste de Ames) é um ensaio utilizado por mais de 20 anos para avaliar,

através da urina, tanto o estilo de vida como a exposição ocupacional a mutagênicos e/ou carcinogênicos potenciais (PAVANELLO *et al.*, 2002a ; MOHAMADI *et al.*, 2003).

A análise da mutagenicidade urinária, avaliada através do teste de Ames, é bem aceita por ser um método adequado para a demonstração da exposição ocupacional a compostos químicos mutagênicos que são excretados na urina de forma inalterada, ou como conjugados, ou ainda na forma de metabólitos mutagênicos (CERNÁ *et al.*, 1997; BOSSO, 2000; HEUSER *et al.*, 2005). A atividade mutagênica na urina já foi demonstrada em indivíduos fumantes (MOHAMADI *et al.*, 2003); ou naqueles que estão em tratamento medicamentoso (GABBANI *et al.*, 1999; JUNEJA *et al.*, 2002). Esse parâmetro também foi usado como biomarcador de exposição ocupacional em vários ambientes de trabalho (BOSSO, 2000; VERMEULEN *et al.*, 2003; HANSEN *et al.*, 2004).

O estudo de Yin *et al.* (1998) demonstrou a mutagenicidade urinária em indivíduos expostos a produtos da combustão de gás liquefeito de petróleo. Trabalhadores de forno de carvão de coque também apresentaram atividade mutagênica urinária mais elevada quando comparada ao grupo controle (MIELZIYNSKA *et al.*, 1997). Choi *et al.* (1995), em um estudo caso-controle, avaliaram a mutagenicidade urinária de 37 pacientes (19 com câncer de bexiga e 18 controles) através do teste de Ames, com a finalidade de detectar exposição ocupacional a diferentes químicos e/ou casos de cânceres de bexiga, e verificaram mutagenicidade urinária positiva em 52% dos indivíduos expostos contra 22% dos indivíduos não expostos. Bosso (2000), estudando a exposição ocupacional em cortadores de cana da região de Araraquara-SP, demonstrou indícios de mutagenicidade urinária nesses indivíduos.

É importante reconhecer o surgimento de compostos genotóxicos no ambiente de trabalho e existe a necessidade de identificar as fontes de contaminação, de modo a apontar esforços para minimizar e controlar essa situação (HOUK, 1992).

## **1.2. A importância dos polimorfismos genéticos (*GSTM1*, *GSTT1* e *CYP2E1*) nos efeitos adversos à saúde, advindos da exposição a xenobióticos.**

Vários fatores, tais como, idade, hábito tabagista, afetam os resultados da atividade mutagênica encontrada nas populações expostas. Entretanto, é evidente que o risco genético não está apenas baseado no potencial genotóxico de agentes ambientais, mas também, nas diferenças na susceptibilidade genética a esses efeitos adversos. Dessa maneira, os genótipos são responsáveis pelas diferenças interindividuais na habilidade para ativar ou detoxificar substâncias genotóxicas, sendo reconhecidos como biomarcadores da susceptibilidade para a mutação, câncer e outras doenças (RIBEIRO *et al.*, 2003).

Devido ao fato de que praticamente todos os organismos vivos estão continuamente expostos a compostos químicos, vários mecanismos de proteção foram desenvolvidos durante o processo evolutivo, sendo a metabolização a mais versátil dessas formas de proteção. Assim, os animais mais evoluídos como o homem, desenvolveram no fígado um mecanismo enzimático que intercepta os xenobióticos como, por exemplo à nicotina, transformando-os em substâncias mais hidrossolúveis, facilmente excretadas do organismo (KLAASSEN, 2001), impedindo seu acúmulo e, conseqüentemente, o surgimento de danos no material genético.

A biotransformação das drogas, em especial as que se processam no fígado, são comumente agrupadas em duas fases: I e II. Na fase I, geralmente realizada pelas enzimas da super-família do citocromo *P-450* (*CYP*), que inclui as reações de oxidação, de redução ou de hidrólise, as drogas podem ser ativadas, inativadas ou terem inalteradas suas atividades.

Na fase II, que é geralmente realizada pelas enzimas da família das glutathione S-transferases (*GSTs*) e N-acetiltransferases (*NATs*) e envolve reações de conjugação, ocorre a inativação total do xenobiótico, caso este ainda não tenha sido inativado na fase I. No entanto,

quando os produtos formados na fase I não sofrem inativação ou são ativados a substâncias mais reativas pelas enzimas da fase II, estes intermediários reativos podem se ligar covalentemente ao DNA e causar diversas formas de dano ao organismo, pois agirão como agentes mutagênicos e/ou carcinogênicos (LANG & PELKONEN, 1999; HANSEN *et al.*, 2004; SEPEHR *et al.*, 2004).

Os genes que codificam as enzimas de fase I e II vêm sendo clonados e identificados em seres humanos e muitos deles mostram-se polimórficos dentro da população, parecendo contribuir para a susceptibilidade individual ao desenvolvimento de tumores (AKTAS *et al.*, 2001; YOKOYAMA *et al.*, 2002). A associação entre polimorfismos nas enzimas *CYPs*, *GSTs* e *NATs* com o aumento de risco cânceres de pulmão e bexiga, têm sido demonstrada em diversos estudos (BARTSCH *et al.*, 2000; YOKOYAMA *et al.*, 2002).

Assim, entre os mecanismos envolvidos no processo de carcinogênese, podemos destacar as alterações em genes responsáveis pela metabolização de xenobióticos, de maneira que distúrbios no balanço entre ativação e detoxificação podem ser uma possível explicação as variações individuais na resposta à exposição a carcinógenos (AUTRUP, 2000; LOKTIONOV, 2004).

O *CYP* compreende uma superfamília de hemoproteínas localizadas na membrana do retículo endoplasmático que, embora presente em todos os tecidos, são expressas em grandes quantidades pelas células hepáticas (AUTRUP, 2000).

Muitas drogas eletrofílicas, assim como xenobióticos, são eliminadas por oxidação no fígado. As hemoproteínas da superfamília *CYP*, responsáveis por essa oxidação, são conhecidas por catalisar a ativação metabólica de muitos compostos químicos para metabólitos mais reativos, que se ligam às macromoléculas celulares (TANAKA *et al.*, 2000; VALOTI *et al.*, 2000; ALEYNIK & LIEBER, 2001).

O genoma humano possui mais de 50 genes diferentes para o *CYP*, subdivididos em 10 famílias, nomeadas com números arábicos (*CYP1* – *CYP10*). Essas famílias são subdivididas em subfamílias, indicadas por uma letra e suas izoenzimas nomeadas por um número arábico. As *CYP1*, *CYP2* e *CYP3* estão intimamente envolvidas no metabolismo de drogas (AUTRUP, 2000).

Os polimorfismos nos genes *CYP* influenciam a capacidade dos indivíduos de converter diferentes compostos pró-carcinogênicos em carcinogênicos e assim, são os principais fatores para a susceptibilidade do indivíduo para o desenvolvimento de câncer induzido quimicamente (INGELMAN-SUNDBERG, 2001). Essa variabilidade na atividade enzimática pode influenciar nos efeitos tóxicos, incluindo a carcinogênese induzida por compostos químicos endógenos (AUTRUP, 2000).

O *CYP2E1* tem sido extensivamente estudado por estar envolvido no metabolismo do etanol (BURIM *et al.*, 2004) e de outros xenobióticos com baixo peso molecular, incluindo as n-nitrosaminas (TANAKA *et al.*, 2000; VALOTI *et al.*, 2000; ALEJNIK & LIEBER, 2001). Muitos substratos da *CYP2E1* são também agentes indutores, incluindo a acetona e o etanol, e a indução dos metabólitos da *CYP2E1* pelo etanol é uma possível explicação para o aumento da incidência de muitos cânceres em alcoolistas (RONIS *et al.*, 1996; MURRAY, 2002). Dentre os substratos para a *CYP2E1*, encontram-se vários solventes: benzeno (JUNXIANG *et al.*, 2002), acetona (FREEMAN *et al.*, 1992), diclorometano (LEHNEBACH *et al.*, 1995), hexano (ALI & TARDIF, 1999), etc.

O polimorfismo da *CYP2E1* tem importante papel na carcinogênese pulmonar em indivíduos com hábitos tabagistas (BARTSCH *et al.*, 2000). O gene *CYP2E1* também está envolvido na interação hepatotóxica em trabalhadores expostos ao clorofórmio e ao tetraclorocarbono (KATSU *et al.*, 1998).

Wan *et al.* (2002), observaram que trabalhadores com genótipo *CYP2E1* c.-1293 C/C and c.-1293 G/C são mais susceptíveis a ação tóxica do benzeno. O Instituto Nacional de Câncer (Universidade do Colorado) e investigadores chineses determinaram o fator de risco para doenças hematológicas em indivíduos expostos ao benzeno e puderam observar que elevada concentração da enzima *CYP2E1* tem papel fundamental nessas doenças. O gene *CYP2E1* faz a conversão do benzeno em óxido de benzeno, que espontaneamente originará o fenol; este sofrerá nova metabolização da *CYP2E1*, formando hidroquinonas, que darão origem as benzohidroquinonas, que são conhecidas pelo seu potencial hematotóxico e genotóxico (ROTHMAN *et al.*, 1997).

Além da ativação dos procarcinógenos, a *CYP2E1* é responsável pela produção de radicais livres que causam injúria tecidual, e são formados tanto na presença como na ausência dos substratos (MURRAY, 2002). Muitos desses radicais, formados pelas reações de fase I, são detoxificados por vários complexos enzimáticos, destacando-se as glutationa-S-transferases.

Dentre os sistemas de detoxificação já descritos, as *GSTs* possuem importante papel, fornecendo proteção contra compostos eletrofílicos e produtos do estresse oxidativo, pois vem sendo sugerido que estas enzimas fazem parte de um mecanismo de resposta adaptativa aos danos causados por compostos químicos (BROCKSTEDT *et al.*, 2002; SCHNEIDER *et al.*, 2004). As *GSTs* estão amplamente distribuídas na natureza, encontradas desde as bactérias até o homem, e são expressas em tecidos de mamíferos (HAYES & PULFORD, 1995).

Indivíduos com genótipo nulo para *GSTM1*, ocupacionalmente expostos ao estireno, apresentaram um aumento na troca entre cromátides irmãs, além de terem um aumento significativo na concentração de metabólitos urinários, quando comparados com indivíduos com *GSTM1* presente (TEIXEIRA *et al.*, 2004).



Pitarque *et al.* (2002), monitorando trabalhadores expostos a solventes orgânicos, observaram que os indivíduos com hábitos tabagistas com genótipo nulo para o *GSTM1* apresentaram um aumento significativo na frequência de micronúcleos.

Danos cromossômicos e concentrações elevadas de aductos de DNA foram detectados nos linfócitos de fumantes e de motoristas de ônibus com genótipos *GSTM1* e *GSTT1* nulos (NORPPA, 2001). Outros estudos também encontraram aumento significativo nos aductos de DNA de indivíduos com genótipo *GSTM1* nulo ocupacionalmente expostos a hidrocarbonetos policíclicos aromáticos - HPAs (BUTKIEWICZ *et al.*, 2000; ROJAS *et al.*, 2000; PAVANELLO *et al.*, 2004).

Estudos recentes demonstram que os genótipos nulos de *GSTM1* e *GSTT1*, separadamente ou combinados, são fatores genéticos de alto risco para o desenvolvimento de tumores. O genótipo *GSTM1* nulo já foi associado ao desenvolvimento de diversos tipos de cânceres, como o de pulmão (GASPAR *et al.*, 2004); bexiga (JOHNS & HOULSTON, 2000); mama (MITRUNEN *et al.*, 2001) e de cabeça e pescoço (BUSCH *et al.*, 2002; MATTHIAS *et al.*, 2002; AU *et al.*, 2003). Por outro lado, Roddi *et al.* (2004), demonstraram aumento estatisticamente significativo no risco de câncer de mama de indivíduos com genótipo *GSTM1* +/+, comparado com o genótipo *GSTM1* -/-. Gudmundsdottir *et al.* (2001) não encontrou aumento no risco de câncer de mama associado a nenhuma combinação dos polimorfismos *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1*.

Dentre os tumores mais frequentemente associados à ausência do gene *GSTM1*, destaca-se o câncer de pulmão, pelo fato de *GSTM1a* e a *GSTM1b* serem ativos na detoxificação de certos epóxidos dos HPAs encontrados na fumaça do cigarro e em outros produtos de combustão (HAYES & PULFORD, 1995). Assim sendo, HPAs presentes no cigarro, incluindo o carcinógeno benzo(a)pireno, requerem primeiramente ativação metabólica pelas enzimas da fase

I (citocromo *P450* e suas formas ativadas) que produzem um intermediário que se constitui no substrato de detoxificação para as enzimas *GSTMI* da fase II.

A frequência do gene *GSTMI* nulo em pacientes chineses com adenocarcinoma de pulmão, segundo Gao & Zhang (1999), foi de 76,9% contra 49,2% em indivíduos saudáveis.

Aktas *et al.* (2001) estudaram a relação entre o genótipo *GSTMI* nulo e o câncer superficial e invasivo de bexiga. A deleção do gene *GSTMI* foi encontrada em 54,3% de todos os pacientes com câncer e em 64,3% dos pacientes que apresentam a forma invasiva do câncer de bexiga.

Rossi *et al.* (1999), avaliaram a excreção de ácido fenilmercaptúrico e t,t-MA (metabólito do benzeno) em motoristas de ônibus municipais, correlacionando com o polimorfismo genético das enzimas de fase I e II, demonstrando altos níveis de excreção urinária do t,t-MA em indivíduos com o genótipo *GSTMI* nulo. Resultados semelhantes foram mostrados por Bergamaschi *et al.* (1999) analisando a urina de ciclistas, e também demonstraram que altos níveis de tolueno e benzeno foram encontrados nos ciclistas com deleção do gene *GSTMI*.

Os diferentes estudos desenvolvidos em vários países, com genes responsáveis pela metabolização de xenobióticos, são de grande importância para a determinação da susceptibilidade genética e poderão futuramente ser utilizados como biomarcadores no auxílio à prevenção e tratamento de várias doenças.

## 2. Objetivos

1- Caracterizar a atividade mutagênica dos compostos eliminados na urina de indivíduos expostos ocupacionalmente a solventes orgânicos, em laboratórios de pesquisa do Instituto de Química – UNESP- Araraquara e seus respectivos controles.

2- Identificar o polimorfismo constitucional desses indivíduos para dois genes da super família glutathiona-S-transferase (*GSTM1* e *GSTT1*) e da família citocromo- P450 (*CYP2E1*).

3- Associar, sempre que possível, a influência desses genótipos (*GSTM1*, *GSTT1* e *CYP2E1*) com a atividade mutagênica urinária dos grupos expostos e controles.

4- Fornecer um melhor entendimento sobre os riscos à saúde decorrentes da exposição aos compostos em questão.

### **3. Material e métodos**

A coleta e avaliação da mutagenicidade das amostras de urina foi realizada em colaboração com o Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química, UNESP - Campus de Araraquara.

#### **3.1. Amostras de urina**

A avaliação da mutagenicidade urinária foi realizada em 30 indivíduos saudáveis e não fumantes, sendo funcionários, alunos e professores com atividade diária nos diversos laboratórios do Instituto de Química – UNESP - Araraquara (grupo exposto – E) e 30 indivíduos controles, não fumantes (grupo controle – C), pareados por sexo e idade. Dentre os diversos solventes que estes indivíduos são expostos estão: acetato de etila, acetonitrila, metanol, acetona, etanol, hexano, benzeno, etc. Todos os indivíduos responderam a um questionário detalhado incluindo informações sobre a história pessoal e ocupacional e saúde em geral (Anexo 1), além de assinarem um termo de consentimento para participação neste estudo (Anexo 2). Esse trabalho foi realizado após a aprovação do Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, UNESP (Anexo 3).

A coleta da urina foi realizada em frascos de polietileno durante o dia de trabalho, até a obtenção de aproximadamente 1000mL. Entre as coletas a urina foi mantida sob refrigeração. A concentração e extração dos compostos presentes na urina seguiu a metodologia descrita por Yamasaki e Ames (1977), utilizando a resina XAD-2, com algumas modificações. A resina foi previamente lavada por agitação e decantação várias vezes com água MilliQ, seguida de metanol. Depois de lavada, a resina passou por soxhlet com metanol em ebulição por 16 horas, e foi armazenada no mesmo solvente a temperatura ambiente até seu uso.

As colunas de vidro com 0,7cm de diâmetro x 10cm foram previamente lavadas com água destilada e na seqüência adicionou-se 0,7g de resina. Para ambientar a resina, foi percolada água milliQ, em seguida a amostra de urina (previamente filtrada e com pH corrigido para 7,0 com NaOH 0,5M) foi percolada com fluxo de 2-3mL de urina/minuto. Os compostos adsorvidos pela resina foram eluídos em 10 mL de acetona. Usou-se o rotaevaporador (45°C) e Concentrator 5301 (Eppendorf®), para evaporar todo o solvente.

O extrato seco foi dissolvido na proporção de 0,4mL de DMSO para cada 100mL equivalente urina, e armazenado a -20°C até o uso. Foram avaliadas 4 concentrações de cada amostra de urina, a saber: 1,5; 3,0; 6,0 e 12,0mL equivalente urina/placa (EINISTÖ, *et al.* 1990).

Anteriormente, aos ensaios de mutagenicidade com as amostras de urina, a resina XAD-2 foi testada. Adotou-se o mesmo procedimento para a adsorção, eluição e concentração das amostras de urina, no entanto, a urina foi substituída por água milliQ. Em seguida, esse extrato (branco da resina XAD-2) foi também avaliado nos ensaios com *Salmonella*/microsomo.

## **3.2. Avaliação da mutagenicidade**

### **3.2.1. Ensaio de mutação gênica reversa**

O ensaio de mutação gênica reversa utilizado nesse trabalho foi o Teste de Ames que baseia-se na utilização de linhagens de *Salmonella typhimurium* auxotróficas para o aminoácido histidina, as quais revertem à prototrofia pelo tratamento com agentes mutagênicos (MARON & AMES,1983).

### **3.2.2. Linhagens de *Salmonella typhimurium***

Foram utilizadas linhagens de *Salmonella typhimurium* TA100, gentilmente fornecida pelo Prof. Dr. Bruce Ames da Universidade de Berkeley, California, EUA e a cepa YG1024 gentilmente cedida pelos Drs. Takehito Nohmi e Watanabe Masahiko do Instituto Nacional de Ciências Higiênicas, Tóquio, Japão. Essas linhagens (Tabela 1) são auxotróficas em relação à histidina, que detectam preferencialmente mutágenos que causam deslocamento do quadro de leitura ou substituição de pares de bases do DNA. Essas cepas possuem várias mutações no operon da histidina que são os alvos para mutação reversa, bem como mutações do tipo *rfa* que causam perda parcial da barreira lipopolissacarídica da parede bacteriana, facilitando a difusão de moléculas grandes para o interior da célula, a deleção do gene *uvrB* que causa deficiência do sistema de reparo por excisão e fator R plasmidial (plasmídeo pKM101) que confere resistência à ampicilina e contém os genes *muc AB*, cuja expressão causa estímulo no sistema de reparo suscetível ao erro (*error prone*). Essas mutações lhes conferem maior sensibilidade na detecção de diversos mutágenos.

A linhagem YG1024 apresenta mutação no gene *hisD* (*his D3052*) que codifica para histidinol desidrogenase, apresentando como ponto preferencial para reversão oito resíduos

repetitivos de GC e detecta compostos mutagênicos que causam deslocamento do quadro de leitura do DNA, além de superproduzir O-acetiltransferases. É uma linhagem mais sensível na detecção de compostos hidroxilaminos, nitro aromáticos e aminas aromáticas (WATANABE *et al.*, 1990).

A TA100 detecta mutágenos que causam substituição de pares de bases no DNA. Contém uma mutação no gene *hisG* (*hisG46*) que codifica para a primeira enzima da biossíntese da histidina, tendo o par GC como ponto preferencial para a reversão (MARON & AMES, 1983).

**Tabela 1:** Descrição comparativa das linhagens bacterianas

Linhagem bacteriana	Descrição
TA100 – <i>rfa</i> , $\Delta$ <i>uvrB</i> , <i>hisG46</i> , <i>bio</i> <sup>-</sup> , PKM101	Linhagem que tem o par GC como ponto preferencial para a reversão
YG1024 –TA98 com pYG219	Linhagem derivada da TA98 com plasmídio que aumenta a atividade da O-acetiltransferase.

### 3.2.3. Meios de cultura

Os meios de cultura foram preparados de acordo com as especificações de Maron & Ames (1983).

O crescimento das linhagens de *S. typhimurium* foi realizado em caldo nutriente Oxoid n.2 e o ágar nutriente foi elaborado a partir do caldo nutriente, com ou sem ampicilina, dependendo do ensaio, solidificado com 1,5% de ágar (Difco).

Nos ensaios de mutagenicidade foi usado ágar mínimo glicosado com traços de histidina/biotina, constituído de ágar glicose (20g de glicose, 15g de ágar e 930 mL de água destilada) e meio Vogel Bonner E 50x concentrado (10g de sulfato de magnésio heptahidratado, 100g de ácido cítrico, 175g de fosfato de sódio de amônio, 500g de fosfato de potássio dibásico e 670 mL de água respectivamente, acrescido de 10 mL de uma solução de L-histidina 0,096 mg/mL (Sigma) e D-biotina 0,123 mg/mL (Sigma). O ágar de superfície (top agar) foi composto de 0,5% de cloreto de sódio e 0,6% de ágar.

Os meios de cultura foram preparados e esterilizados em autoclave a 121° C por 15 minutos quando não especificados.

#### **3.2.4. Manutenção e estoque das culturas**

As cepas de *S. typhimurium* foram armazenadas em freezer -80° C, em frascos para congelamento com 0,9 mL de cultura e 0,1 mL de DMSO como agente crioprotetor.

#### **3.2.5. Confirmação dos genótipos das linhagens de *S. typhimurium***

##### **a) Auxotrofia para histidina**

As culturas bacterianas foram estriadas com alça de platina em placas controle de ágar mínimo acrescidas de histidina e biotina e em placas testes contendo apenas biotina. A biotina é requerida, uma vez que a deleção do gene *uvrB* se estende até o gene responsável por sua síntese. Após incubação por 24h a 37°C, as placas testes contendo apenas biotina não devem apresentar crescimento, enquanto as placas suplementadas com histidina e biotina apresentam crescimento.

##### **b) Mutação *rfa***



A mutação no gene *rfa* confere sensibilidade ao cristal violeta. As culturas de *S. typhimurium* foram inoculadas em placas de ágar nutriente utilizando-se de cotonetes estéreis de forma a se obter um crescimento homogêneo. A seguir, foi colocado no centro da placa, um disco de papel de filtro de 5mm de diâmetro embebido com 10 µL de uma solução de cristal violeta a 1%. As cepas devem apresentar um halo de inibição de, no mínimo 14 mm de diâmetro após incubação a 37° C por 24h.

c) Plasmídeo pKM101

A presença do plasmídeo pKM101 foi confirmada através da resistência ao antibiótico ampicilina. As culturas bacterianas foram semeadas perpendicularmente a uma estria de solução de ampicilina 8mg/mL em placas de ágar nutriente. Após incubação a 37°C por 24h, as cepas portadoras do plasmídeo pKM101 apresentam crescimento contínuo através das estrias da solução de ampicilina.

d) Deleção *uvrB*

A mutação *uvrB* confere sensibilidade à radiação ultravioleta, devido à deficiência no mecanismo de reparo por excisão. As culturas de *Salmonella* foram semeadas em placas de ágar nutriente utilizando-se cotonetes estéreis. A seguir, metade da placa foi coberta com papel alumínio e irradiada com lâmpada germicida (ultravioleta) de 15watts a uma distância de 33cm por 8 segundos. Após incubação a 37°C por 24h, as cepas portadoras dessa deleção crescem apenas na metade da placa não irradiada (coberta).

e) Taxa de reversão espontânea

A taxa de reversão espontânea foi determinada inoculando-se 100µL de cada cultura ( $10^9$  bactérias) em 2 mL de ágar de superfície estabilizado a 45°C e vertendo-se essa mistura, após homogeneização, sobre uma placa de ágar mínimo. O ensaio foi realizado em

triplicata e o número de colônias revertentes espontâneas obtidas após 48h de incubação a 37° C deve estar dentro da faixa esperada para cada cepa, a saber :

TA100: 75 - 225 revertentes/ placa

YG1024 : 20 - 75 revertentes /placa.

### **3.2.6. Sistema de ativação metabólica**

Os testes de mutagenicidade foram realizados em presença e ausência de ativação metabólica. O sistema utilizado foi a fração microsomal S9 (S9 mix ) preparada a partir de homogeneizados de fígado de ratos Sprague Dawley, previamente tratados com Arocloror 1254, adquiridos sob a forma liofilizada da Moltax Molecular Toxicology Inc., Annapolis, USA.

Volumes adequados da mistura de ativação S9 foram preparados no momento do ensaio e mantidos em gelo durante sua execução. Após o ensaio, a mistura não utilizada foi descartada. Foi utilizada a mistura padrão recomendada por Maron & Ames (1983), constituída de 4% de fração S9; 1% de cloreto de magnésio 0,4M; 1% de cloreto de potássio 1,65M; 0,5% de D-glicose-6-fosfato 1 M; 4% de B- nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato 0,1 M; 50 % de tampão fosfato de sódio 0,2 M pH 7,4 (81% de fosfato de sódio dibásico 0,2 M e 19 % de fosfato de sódio monobásico 0,2 M) e 39,5% de água destilada estéril. Todos os reagentes, quando não especificados foram procedentes da Sigma e Merck.

### **3.2.7. Procedimento do ensaio de acordo com Maron e Ames (1983)**

Para a realização experimental do teste de mutagenicidade foi utilizado o método de pré-incubação, empregando as linhagens TA100 e YG1024. O método de pré-incubação é uma modificação do ensaio padrão de incorporação em placa, primeiramente introduzido por Yahagi *et al.* (1975) a fim de detectar a atividade mutagênica de tinturas

carcinogênicas. Nessa técnica, a bactéria, a substância teste e a mistura S9, quando usada, são incubadas antes de serem transferidas para a placa com ágar. Para o início dos ensaios as bactérias foram inoculadas com a alça de platina em 30mL de caldo nutriente e mantidas a 37°C, sob agitação constante (160rpm) durante 14 h, de modo a se obter uma densidade de 1 a  $2 \times 10^9$  bactérias/mL. Em tubos de ensaio foram colocados 0,1mL da cultura (pernoite) de bactérias, a concentração adequada do extrato seco dissolvido em DMSO e 0,5mL de tampão fosfato pH 7,4 nos ensaios sem metabolização. Nos ensaios com ativação metabólica foi adicionado 0,5mL da mistura S9 (fração pós-mitocondrial, suplementada com cofatores e preparada a partir de fígado de ratos tratados com agentes indutores de enzimas Arocloror 1254). A mistura S9 revela se a substância ou amostra é mutagênica em sua forma original ou se necessita ser metabolizada ou ativada para ser mutagênica. Os tubos assim compostos foram incubados a 37° C durante 20 minutos. Após esse tempo, foram adicionados 2mL de ágar superfície acrescido de uma solução de histidina/biotina 0,05mM na proporção de 10/100 mL. Em seguida, os tubos foram agitados e vertidos em placas de Petri que já continham o meio mínimo glicosado. Estas placas foram incubadas por 48 horas a 37° C. Transcorrido o tempo necessário, foi efetuada a contagem das colônias revertentes. Todas as concentrações testadas (que foram em número de 4), controles positivos e negativos foram realizados em triplicata.

### **3.2.8. Controles**

Paralelamente a cada ensaio, foram realizados controles positivo e negativo. Como controle negativo foi usado o DMSO, o solvente do extrato. O volume de DMSO usado foi de 50µL. Os controles positivos são compostos mutagênicos específicos para cada cepa e condição do ensaio, sendo: 4-nitro-fenilenediamina para cepa YG1024 e azida sódica para

TA100, em ensaios sem fração S9; 2-antramina para TA100 e YG1024 em ensaios com ativação metabólica.

### **3.3. Estudo dos polimorfismos enzimáticos**

#### **3.3.1. Extração e quantificação do DNA genômico**

A extração do DNA foi feita de sangue total (EDTA) fresco, utilizando o Kit WIZARD<sup>®</sup> (Genomic DNA Purification Kit) da Promega, de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. A quantificação do DNA foi feita por absorvância UV, de modo a ser estocado em alíquotas de 25 µl, à concentração de 50 ng/µl, e mantido à -4°C até o uso.

#### **3.3.2. Amplificação das seqüências de DNA e detecção dos genótipos**

Para todos os polimorfismos estudados, os fragmentos foram amplificados no termociclador PTC-100 (MJ *Research, Inc*) e submetidos à eletroforese (95V) em cuba contendo tampão TBE 0,5X (LGG Biotecnologia), para a detecção dos genótipos *GSTMI*, *GSTTI* e *CYP2E1*.

As reações foram visualizadas em gel de agarose (Labtrade) 2,0% feito também com tampão TBE 0,5X e corado com 2 µl de brometo de etídio (na concentração de 10 mg/ml), e 4 µl de tampão de amostra (0,25% de azul de bromofenol, 15% de Ficoll em água) para a visualização da corrida. Na eletroforese para a detecção dos genótipos *GSTMI* e *GSTTI* usou-se 95V, assim como na primeira eletroforese para o genótipo *CYP2E1*. Após a digestão dos produtos da PCR para o *CYP2E1* a eletroforese foi feita em 60V.

Para comparar o peso das bandas foi usado marcador de peso molecular de 100 pares de base (pb) diluído. Em todos os casos, foi usado também um branco (todos os reagentes exceto o DNA), com o intuito de assegurar que não houve contaminação das amostras. Os géis foram observados e fotografados com filme polaróide em transiluminador de luz ultravioleta.

### 3.3.3. Detecção dos genótipos *GSTM1* e *GSTT1* por PCR- multiplex

A reação de co-amplificação em cadeia foi realizada baseada no protocolo para PCR Multiplex de Abdel-Rahman *et al.* (1996) modificado, onde foram utilizados: 21,5µl de PCR mix (Invitrogen); 1,0 µl (100ng/µl) de cada primer (Invitrogen): *GSTM1* (5'-GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC e 5'-GTTGGGCTCAAATATACGGTGG), *GSTT1*: (5'-TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC e 5'-TCACCGGATCATGGCCAGCA) e *CYP1A1*(5'-GAACTGCCACTTCAGCTGTCT e 5'-CAGCTGCATTTGGAAGTGCTC) e 2,0 µl (100 ng) de DNA genômico. Os ciclos de co-amplificação foram de: 95°C por 5 minutos, 30 ciclos de 94°C por 2 min., 59°C por 1 min. e 72°C por 1 min., seguidos de uma extensão final (4 min. a 72°C).

Os primers para *CYP1A1* amplificam um fragmento constante de 312 pb, o qual foi usado como controle interno da reação, excluindo a possibilidade de uma falsa interpretação dos resultados devido à ausência da reação de amplificação. O fragmento de 215 pb pode ser visto somente nos casos de indivíduos que possuem o gene *GSTM1*. O fragmento de 480 pb pode ser visto somente nos casos de indivíduos que possuem o gene *GSTT1*. A ausência de amplificação *GSTM1* (215 pb) ou *GSTT1* (480 pb), na presença de controle interno, indica os respectivos genótipos nulos para cada gene.

### 3.3.4. Detecção do genótipo *CYP2E1-PstI*

A reação de amplificação em cadeia por PCR e o polimorfismo RFLP (polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição) *PstI* do gene *CYP2E1*, foi realizada de acordo com Anwar *et al.* (1996) modificado, onde foram utilizados: 21,5µl de PCR mix (Invitrogen); 1,0 µl (100ng/µl) de cada primer (Invitrogen): *CYP2E1*<sub>1</sub> (5' CCA GTC GAG TCT ACA TTG TCA 3') e *CYP2E1*<sub>2</sub> (5' TTC ATT CTG TCT TCT AAC TGG 3') e 2,0 µl (100 ng) de DNA genômico. Os ciclos de amplificação foram de: 95°C por 1 minuto, 26 ciclos de 95°C por 1 min., 55°C por 1 min. e 72°C por 1 min., seguidos de uma extensão final (4 min. a 72°C).

Após a reação de amplificação, 20µl do produto de PCR foram digeridos com 6U (0,3µl) da enzima *PstI* (Gibco - BRL), 2,2µl de H<sub>2</sub>O e 2,5µl de tampão React 2, a 37°C por 1 hora, e então analisado em gel de agarose (Gibco-BRL) 2,0% submetido a eletroforese a 60V.

O par de primers *CYP2E1*<sub>1</sub> e *CYP2E1*<sub>2</sub> gera um produto de amplificação constante de 410pb, referente ao genótipo homozigoto normal (c1/c1), o qual não sofre ação da enzima *PstI*, originando uma banda não clivada. O genótipo homozigoto mutante (c2/c2) possui um sítio para a enzima de restrição *PstI*, que cliva o produto da amplificação, gerando uma banda de 290 e outra de 120pb, e o genótipo heterozigoto (c1/c2) apresenta as três bandas: 410, 290 e 120pb.

#### **4. Avaliação e interpretação dos resultados**

Os dados da mutagenicidade urinária foram analisados utilizando o programa estatístico Salanal elaborado e gentilmente cedido pelo Dr. L. Myers do Research Triangle Institute, RTP, Carolina do Norte, USA. Esse programa permite avaliar o efeito dose-resposta através do cálculo da análise de variância (ANOVA – teste F) entre as médias do número de revertentes nas diferentes doses testadas e o controle negativo, seguido de uma regressão linear. A inclinação da reta da parte linear da curva dose-resposta é também fornecida por esse programa e por extrapolação fornece a potência mutagênica de cada amostra, que corresponde ao número de revertentes induzidos por mL equivalente de urina.

A partir dos resultados obtidos, foi calculado o razão de mutagenicidade (RM) para cada dose analisada, que é a média do número de revertentes na placa teste (espontâneos mais induzidos) dividida pela média do número de revertentes por placa do controle negativo (espontâneos). A amostra foi considerada positiva quando a razão de mutagenicidade (RM) foi maior ou igual a 2 em pelo menos uma das doses testadas e quando houve uma relação dose resposta entre as concentrações testadas e o número de revertentes induzidos (VALENT *et al.*, 1993; VARGAS *et al.*, 1993; VARELLA *et al.*, 2004b). Por sua vez, a amostra foi considerada

negativa para o teste de Ames, quando a mesma não induziu aumento significativo no número de revertentes e seus RM foram todos menores que 2.

Os dados da mutagenicidade urinária dos grupos controle e exposto, foram comparados utilizando o programa estatístico BioEstat 2.0, através do teste de Mann-Whitney (significância a 5%). O mesmo teste estatístico, foi utilizado para determinar a dependência entre mutagenicidade urinária e os polimorfismos genéticos dos genes *GSTM1*, *GSTT1* e *CYP2E1*, de todos os indivíduos amostrados.

A dependência entre as variáveis, sexo, idade e etnia, e o genótipo foram avaliadas usando o teste do  $\chi^2$  (qui-quadrado).



## 5. Resultados

### 5.1. Caracterização das amostras estudadas

Foram avaliados 60 indivíduos, divididos em dois grupos, controle (C) e exposto (E). Na Tabela 2 onde indivíduos estão pareados segundo o sexo e a idade ( $\pm 7$ anos), observa-se que a maioria é do sexo feminino (20 em cada grupo) , pertencente ao grupo étnico caucasiano (19 e 18, grupo controle e exposto, respectivamente) e com faixa etária entre 19 e 54 anos ( $28 \pm 9$  e  $29,3 \pm 7,7$ ; grupo controle e exposto, respectivamente). No restante das tabelas, os indivíduos não estão pareados segundo o sexo e a idade.

**Tabela 2:** Caracterização dos indivíduos dos grupos, controle e exposto, em relação ao sexo, grupo étnico e idade.

Código	Sexo F/M	Etnia	Idade (anos)	Código	Sexo F/M	Etnia	Idade (anos)
07C	M	C	42	36E	M	C	35
11C	M	C	39	30E	M	C	33
36C	M	C	33	45E	M	C	33
18C	M	C	27	50E	M	C	32
22C	M	C	26	10E	M	C	32

## Continuação

Código	Sexo F/M	Etnia	Idade (anos)	Código	Sexo F/M	Etnia	Idade (anos)
33C	M	C	25	07E	M	C	27
23C	M	C	25	38E	M	N	27
35C	M	C	23	47E	M	C	22
21C	M	C	22	44E	M	C	20
19C	M	C	20	16E	M	O	20
02C	F	C	49	31E	F	C	54
32C	F	C	48	06E	F	C	49
04C	F	C	43	23E	F	C	38
27C	F	C	42	02E	F	C	35
13C	F	C	34	18E	F	C	33
09C	F	C	30	40E	F	C	32
08C	F	C	29	17E	F	C	31
16C	F	C	29	09E	F	C	30
24C	F	C	28	39E	F	C	30
34C	F	C	25	19E	F	C	29
39C	F	C	23	27E	F	C	28
14C	F	C	22	48E	F	N	27
29C	F	C	21	29E	F	C	26
20C	F	C	20	26E	F	C	23
25C	F	C	20	35E	F	C	23
26C	F	C	20	46E	F	C	23
17C	F	C	19	28E	F	C	23
37C	F	C	19	33E	F	C	22
30C	F	N	19	54E	F	C	22
38C	F	C	19	43E	F	O	21

C: grupo controle; E: grupo exposto, M: sexo masculino; F: sexo feminino; C: caucasianos; N: negros e O: orientais.

**Tabela 3:** Caracterização dos indivíduos, através da frequência, segundo os hábitos alimentares, consumo de bebidas alcoólicas, uso de medicamentos e tempo de exposição.

	Consumo de vegetais	Consumo de bebidas alcoólicas	Uso de medicamentos	Tempo de exposição
<b>GRUPO CONTROLE</b>	2 (6,7%) não comem	7 (23,3%) não bebem	1 (3,3%) ansiolíticos	
	28 (93,3%) comem	14 (46,7%) bebem eventualmente	2 (6,7%) analgésicos	
		9 (30%) 1-4 copos/semana	3 (10%) outros	
			24 (80%) nenhuma medicação	
<b>GRUPO EXPOSTO</b>	2 (6,7%) não comem	9 (30%) não bebem	1 (3,3%) ansiolíticos	17 (56,6%) 1-5anos
	28 (93,3%) comem	13 (43,3%) bebem eventualmente	3 (10%) antiinflamatórios	7 ( 23,3%) 6-10 anos
		8 (26,7%) 1-4 copos/semana	7 (23,4%) analgésicos	6 (20%) mais de 10 anos
		3 (10%) outros	16 (53,3%) nenhuma medicação	

F: sexo feminino; M: sexo masculino; (frequência/30 indivíduos).

A Tabela 3 apresenta, a caracterização dos indivíduos que participaram desse estudo, através da distribuição da frequência, segundo o consumo de vegetais, consumo de bebidas alcoólicas, uso de medicamentos e tempo de exposição aos solventes orgânicos. Dos indivíduos de cada grupo, 6,7% não comem vegetais, 3,3% usam ansiolíticos e 10% outros tipos de medicamentos. Entre os voluntários desse estudo, grupo controle e exposto, respectivamente, 80% e 53,4% não tomam nenhum tipo de bebida alcoólica, 46,7% e 43,3% eventualmente tomam bebidas com teor alcoólico, 30% e 26,7% apresentam um consumo de bebida alcoólica entre 1 a 4 copos por semana., 6,7% e 23,4% fazem uso de analgésicos, 80% e 53,3% não tomam nenhuma medicação. Apenas os voluntários (10%) do grupo exposto tomam antiinflamatórios. Todos os voluntários foram orientados para fazer a coleta de urina quando não tivessem usando medicamentos. O tempo de exposição a solventes orgânicos variou de 1 a 21anos. Dentre os

voluntários, o tempo de exposição variou entre 1 e 5 anos em 56,7% , 6 e 10 anos em 23,3% e, mais que 10 anos em 20% dos indivíduos avaliados.

## 5.2. Atividade mutagênica dos extratos orgânicos de urina

A atividade mutagênica dos extratos orgânicos da urina do grupo controle (C) e do grupo exposto (E) a solventes orgânicos, adsorvidos pela resina XAD-2, foi avaliada através de ensaios com mutação gênica reversa em *Salmonella typhimurium* usando-se as linhagens TA100 e YG1024, tanto na presença quanto na ausência de metabolização. Anteriormente aos ensaios de mutagenicidade com as amostras de urina, foi feito um branco para a resina XAD-2, realizando-se o mesmo procedimento de adsorção, eluição e concentração adotados para a obtenção dos extratos orgânicos de urina, porém, a urina foi substituída por água milliQ. Em seguida, esse extrato (branco) foi avaliado no teste de Ames, onde não apresentou atividade mutagênica.

Nas tabelas de 4 e 5 estão os resultados obtidos nos ensaios das amostras de urina dos grupos controle e exposto, respectivamente, com análise estatística descritiva indicando média (M), desvio padrão (SD) do número de revertentes his+/placa e razão de mutagenicidade (RM) nas diferentes doses testadas, com as linhagens TA100 e YG1024, tanto em presença (+S9) como ausência (-S9) de metabolização.

Do total de amostras avaliadas, 10 apresentaram resultados significativos para RM e efeito dose-resposta, sendo, 3 amostras pertencentes ao grupo controle (04C, 17C e 36C) e o restante ao grupo exposto (02E, 09E, 39E, 40E , 44E, 45E e 54E).

As amostras 04C e 17C (Tabela 4) foram mutagênicas na linhagem TA100 (-S9) com RM entre 1,3 e 2,5, e número de colônias his+ revertentes entre 141 e 390. Foi observada atividade mutagênica positiva da amostra 36C (Tabela 4) apenas na linhagem

YG1024 (-S9), os valores de RM variaram de 1,6 a 2,0, com valores de 43 a 55 no número de colônias his+ revertentes.

Foi observada atividade mutagênica das amostras 02E, 09E, 39E, 40E, 44E e 45E (Tabela 5) na linhagem YG1024, com metabolização. O valor de RM variou de 1,3 a 3,3 e o número de colônias his+ revertentes variou de 29 a 88. A amostra 54E (Tabela 5) foi mutagênica para a linhagem YG1024, apenas na ausência de metabolização, com RM entre 1,9 e 2,2 e número de colônias his+ revertentes entre 48 e 60.

A Tabela 6, mostra as potências mutagênicas (número de revertentes his+/mL equivalente urina) das amostras do grupo controle e exposto, que apresentaram resposta mutagênica positiva, em pelo menos um dos ensaios (TA100 ou YG1024, com metabolização ou sem metabolização).

Em ensaios com a linhagem TA100, em ausência de metabolização, duas amostras do grupo controle apresentaram potências de 2,3 e 19,2 revertentes/mL equivalente de urina. Para a linhagem YG1024 (-S9), apenas uma amostra do grupo controle (13,8 revertentes/mL equivalente de urina) e uma do grupo exposto (2,6 revertentes/mL equivalente de urina) apresentaram atividade mutagênica. Porém, em presença de S9, seis amostras de urina do grupo exposto foram positivas, com potências que variaram de 1,8 a 25,1 revertentes/mL equivalente de urina.

A Tabela 7, mostra os maiores valores de RM obtidos para o grupo exposto e controle e, as Figuras 2 a 5 ilustram esses resultados. Verificou-se que os valores do RM das amostras de urina em ensaios com a linhagem YG1024 em presença do sistema de ativação metabólica (Figura 5), demonstram um número maior de amostras com  $RM \geq 2,0$  no grupo exposto, quando comparado ao número de amostras com a mesma característica no grupo controle. Em ausência de S9 (Figura 4), observa-se um perfil semelhante, em ambos os grupos

(exposto e controle); destacando-se duas amostras do grupo controle (36C e 38C). Por outro lado, na Figura 2, observa-se que para a linhagem TA100 (-S9), o grupo controle apresentou um número maior de extratos urinários com  $RM \geq 2,0$ ; comparado ao grupo exposto aos solventes. Em presença de metabolização (Figura 3), observa-se um perfil semelhante, em ambos os grupos (exposto e controle). Analisando estatisticamente (Tabela 7), esses dados mostram um aumento significativo ( $p = 0,008$ ) nos valores de RM das amostras de urina do grupo exposto, comparado ao grupo controle, apenas para a linhagem YG1024 (+S9).

A Tabela 8, mostra o índice de aumento relativo (maior número de revertentes his+ obtido de cada amostra de urina, menos o número de revertentes his+ espontâneas; dividido pelo número de revertentes his+ espontâneas), para cada amostra de urina do grupo controle e exposto em todos os ensaios de mutagenicidade. Esses resultados demonstram um aumento significativo ( $p = 0,002$ ) na média dos índices de aumento relativo das amostra de urina do grupo exposto, comparado ao grupo controle, apenas para a linhagem YG1024 (+S9).

Não apresentaram nenhuma atividade mutagênica as amostras, 07C,14C e 19C (Tabela 4), 06E, 18E e 50E (Tabela 5).

Em 24 amostras do grupo controle e em 20 amostras do grupo exposto, observou-se apenas resultados significativos em um dos parâmetros avaliados (o efeito dose-resposta). A linhagem YG1024 (+S9) foi a que detectou mais amostras, com efeito dose resposta significativo, sendo 17 no grupo controle e 16 no grupo exposto.

Apresentaram indícios de citotoxicidade, avaliada pela diminuição dos revertentes e pela análise do *background law*, normalmente para as maiores concentrações testadas, as amostras: 8C, 9C, 32C (Tabela 4), 09E, 33E e 36E (Tabela 5) para a linhagem TA100(-S9); 13C, 16C, 33C (Tabela 4), 6E, 9E, 18E, 19E, 29E e 38E (Tabela 5) para linhagem

TA100(+S9); 20C (Tabela 4), 6E e 48E (Tabela 5) para a linhagem YG1024 (-S9); 18E (Tabela 5) para a linhagem YG1024 (+S9).

Os resultados obtidos demonstram que apenas para a linhagem YG1024 na presença de ativação metabólica houve aumento significativo nos valores de RM ( $p = 0.008$ ) e no índice de aumento relativo ( $p = 0,002$ ), encontrados no grupo exposto em relação ao grupo controle, sugerindo a presença de maior quantidade de mutágenos indiretos na urina dos indivíduos expostos ocupacionalmente aos solventes.

**Tabela 4:** Atividade mutagênica expressa pela média (M) e desvio padrão (SD) do número de revertentes/placa e razão de mutagenicidade (RM) dos extratos orgânicos de urina do grupo controle (C), nas diferentes doses, utilizando-se as linhagens TA100 e YG1024 tanto na presença (+S9) quanto na ausência (-S9) de ativação metabólica.

Código da amostra	mL equivalente de urina/placa	N° de colônias revertentes his+/placa, M ± SD (RM)			
		TA100		YG1024	
		-S9	+S9	-S9	+S9
02C	0	125 ± 12	116 ± 5	20 ± 1	22 ± 1
	1,5	124 ± 2 (1,0)	124 ± 2 (1,0)	21 ± 1 (1,1)	22 ± 1 (1,0)
	3,0	126 ± 1 (1,0)	126 ± 4 (1,1)	23 ± 1 (1,2)	24 ± 2 (1,1)
	6,0	124 ± 2 (1,0)	131 ± 2 (1,1)*	25 ± 2 (1,3)*	27 ± 1 (1,2)*
	12,0	128 ± 7 (1,0)	128 ± 2 (1,1)*	25 ± 1 (1,3)*	26 ± 1 (1,2)*
04C	0	108 ± 4	103 ± 6	19 ± 1	21 ± 4
	1,5	141 ± 11 (1,3)*	116 ± 15 (1,1)	20 ± 5 (1,1)	23 ± 1 (1,1)
	3,0	142 ± 6 (1,3) **	111 ± 9 (1,1)	24 ± 6 (1,3)	25 ± 2 (1,2)
	6,0	158 ± 4 (1,5)**	136 ± 6 (1,3)**	28 ± 4 (1,5)*	25 ± 4 (1,2)
	12,0	240 ± 78 (2,2) **	155 ± 8 (1,5)**	28 ± 2 (1,5)**	29 ± 1 (1,4)
07C	0	125 ± 12	128 ± 7	21 ± 3	18 ± 3
	1,5	145 ± 16 (1,2)	151 ± 33 (1,2)	20 ± 1 (1,0)	16 ± 3 (0,9)
	3,0	140 ± 3 (1,1)	132 ± 9 (1,0)	24 ± 2 (1,2)	22 ± 2 (1,2)
	6,0	136 ± 25 (1,1)	135 ± 2 (1,1)	21 ± 2 (1,1)	18 ± 1 (1,0)
	12,0	125 ± 32 (1,0)	140 ± 2 (1,1)	26 ± 2 (1,3)	20 ± 3 (1,1)
08C	0	144 ± 18	151 ± 16	29 ± 9	25 ± 2
	1,5	151 ± 19 (1,0)	148 ± 8 (1,0)	33 ± 3 (1,1)	28 ± 1 (1,1)
	3,0	141 ± 4 (1,0)	177 ± 20 (1,2)	36 ± 3 (1,2)	33 ± 1 (1,3)**
	6,0	150 ± 9 (1,0)	145 ± 26 (1,0)	33 ± 2 (1,1)	26 ± 1 (1,0)
	12,0	123 ± 6 (0,9)	138 ± 40 (0,9)	33 ± 1 (1,1)	36 ± 1 (1,4)**
09C	0	177 ± 5	139 ± 5	29 ± 9	21 ± 3
	1,5	100 ± 6 (0,6)	145 ± 8 (1,0)	31 ± 4 (1,1)	29 ± 3 (1,4)
	3,0	125 ± 10 (0,7)	157 ± 13 (1,1)	29 ± 5 (1,0)	29 ± 1 (1,4)*
	6,0	120 ± 6 (0,7)	149 ± 3 (1,2)	27 ± 4 (0,9)	32 ± 3 (1,5)*
	12,0	137 ± 7 (0,8)	150 ± 5 (1,2)	30 ± 6 (1,0)	38 ± 6 (1,8)*
11C	0	144 ± 18	139 ± 5	29 ± 9	21 ± 3
	1,5	157 ± 26 (1,1)	154 ± 2 (1,1)*	27 ± 3 (0,9)	29 ± 1 (1,4)*
	3,0	141 ± 13 (1,0)	160 ± 7 (1,2)*	26 ± 3 (0,9)	28 ± 4 (1,3)
	6,0	130 ± 7 (0,9)	174 ± 24 (1,3)	27 ± 1 (0,9)	32 ± 3 (1,5)*
	12,0	146 ± 14 (1,0)	149 ± 14 (1,1)	30 ± 2 (1,0)	28 ± 3 (1,3)
13C	0	168 ± 4	138 ± 12	29 ± 9	21 ± 3
	1,5	178 ± 19 (1,1)	166 ± 25 (1,2)	23 ± 4 (0,8)	28 ± 3 (1,3)
	3,0	185 ± 4 (1,1)	162 ± 21 (1,2)	27 ± 1 (0,9)	25 ± 3 (1,2)
	6,0	186 ± 16 (1,1)	146 ± 16 (1,1)	26 ± 6 (0,9)	34 ± 5 (1,6)*
	12,0	174 ± 6 (1,0)	30 ± 6 (0,2)	30 ± 1 (1,0)	18 ± 5 (0,9)
Controle +		1271 ± 44	1472 ± 58	1822 ± 50	1021 ± 36



continuação

Código da amostra	mL equivalente de urina/placa	N° de colônias revertentes his+/placa, M ± SD (RM)			
		<u>TA100</u>		<u>YG1024</u>	
		-S9	+S9	-S9	+S9
14C	0	159 ± 17	136 ± 7	25 ± 2	38 ± 6
	1,5	175 ± 10 (1,1)	137 ± 7 (1,0)	23 ± 1 (0,9)	38 ± 8 (1,0)
	3,0	131 ± 5 (0,8)	110 ± 14 (0,8)	21 ± 6 (0,8)	42 ± 4 (1,1)
	6,0	180 ± 4 (1,1)	126 ± 4 (0,9)	25 ± 3 (1,0)	45 ± 4 (1,2)
	12,0	151 ± 14 (0,9)	118 ± 2 (0,9)	23 ± 3 (0,9)	44 ± 5 (1,2)
16C	0	170 ± 9	138 ± 12	22 ± 1	32 ± 1
	1,5	175 ± 1 (1,0)	158 ± 4 (1,1)	15 ± 3 (0,7)	27 ± 1 (0,8)
	3,0	191 ± 11 (1,1)	117 ± 12 (0,8)	22 ± 5 (1,0)	44 ± 2 (1,4)*
	6,0	177 ± 5 (1,0)	111 ± 2 (0,8)	22 ± 3 (1,0)	38 ± 0 (1,2)
	12,0	194 ± 1 (1,1)	103 ± 7 (0,7)	23 ± 3 (1,0)	34 ± 1 (1,1)
17C	0	159 ± 17	136 ± 7	25 ± 2	38 ± 6
	1,5	246 ± 14 (1,5)**	156 ± 6 (1,1)	17 ± 2 (0,7)	43 ± 13 (1,1)
	3,0	236 ± 5 (1,5)*	153 ± 20 (1,1)	25 ± 2 (0,9)	37 ± 5 (1,0)
	6,0	340 ± 15 (2,1)**	195 ± 7 (1,4)**	27 ± 7 (1,1)	44 ± 6 (1,2)
	12,0	390 ± 6 (2,5)**	262 ± 4 (1,9)**	39 ± 8 (1,6)*	41 ± 2 (1,1)
18C	0	159 ± 17	136 ± 7	25 ± 2	38 ± 6
	1,5	145 ± 18 (0,9)	141 ± 19 (1,0)	26 ± 4 (1,0)	42 ± 2 (1,1)
	3,0	165 ± 12 (1,0)	124 ± 10 (0,9)	30 ± 2 (1,2)	49 ± 10 (1,3)
	6,0	169 ± 5 (1,1)	135 ± 6 (1,0)	34 ± 4 (1,4)	53 ± 9 (1,4)
	12,0	172 ± 27 (1,1)	115 ± 22 (0,8)	38 ± 1 (1,5)**	53 ± 4 (1,4)
19C	0	129 ± 8	162 ± 6	27 ± 2	26 ± 1
	1,5	123 ± 6 (1,0)	162 ± 12 (1,0)	26 ± 4 (1,0)	20 ± 2 (0,8)
	3,0	130 ± 3 (1,0)	166 ± 4 (1,0)	24 ± 4 (0,9)	21 ± 6 (0,8)
	6,0	128 ± 4 (1,0)	159 ± 6 (1,0)	25 ± 2 (0,9)	22 ± 5 (0,8)
	12,0	128 ± 1 (1,0)	166 ± 2 (1,0)	30 ± 1 (1,1)	25 ± 4 (1,0)
20C	0	129 ± 8	162 ± 6	27 ± 2	26 ± 1
	1,5	116 ± 5 (0,9)	183 ± 11 (1,1)	24 ± 3 (0,9)	26 ± 5 (1,0)
	3,0	132 ± 4 (1,0)	178 ± 15 (1,1)	24 ± 2 (0,9)	24 ± 2 (0,9)
	6,0	150 ± 9 (1,2)	175 ± 3 (1,1)	22 ± 1 (0,8)	37 ± 6 (1,4)
	12,0	123 ± 6 (1,0)	185 ± 3 (1,1)*	24 ± 3 (0,9)	33 ± 1 (1,3)**
21C	0	129 ± 8	162 ± 6	27 ± 2	26 ± 1
	1,5	191 ± 12 (1,5)**	179 ± 7 (1,1)	26 ± 2 (1,0)	23 ± 1 (0,9)
	3,0	188 ± 2 (1,5)**	186 ± 10 (1,1)	33 ± 2 (1,2)	28 ± 2 (1,1)
	6,0	174 ± 7 (1,3)**	193 ± 2 (1,2)**	29 ± 2 (1,1)	30 ± 1 (1,2)*
	12,0	180 ± 8 (1,4)**	189 ± 7 (1,2)*	28 ± 3 (1,0)	29 ± 3 (1,1)
22C	0	128 ± 8	162 ± 6	27 ± 2	26 ± 1
	1,5	135 ± 6 (1,1)	189 ± 6 (1,2)*	21 ± 1 (0,8)	25 ± 2 (1,0)
	3,0	184 ± 10 (1,4)**	177 ± 16 (1,1)	26 ± 2 (1,0)	19 ± 1 (0,7)
	6,0	188 ± 6 (1,5)**	173 ± 7 (1,1)	24 ± 4 (0,9)	25 ± 2 (1,0)
	12,0	183 ± 4 (1,4)**	195 ± 3 (1,2)**	36 ± 5 (1,3)	24 ± 1 (1,0)
Controle +		1184 ± 111	1920 ± 68	1608 ± 99	1720 ± 244

continuação

Código da amostra	mL equivalente de urina/placa	N° de colônias revertentes his+/placa, M ± SD (RM)			
		TA100		YG1024	
		-S9	+S9	-S9	+S9
23C	0	129 ± 8	162 ± 6	27 ± 2	26 ± 1
	1,5	191 ± 2 (1,5)**	181 ± 10 (1,1)	24 ± 2 (0,9)	29 ± 2 (1,1)
	3,0	180 ± 13 (1,4)*	158 ± 7 (1,0)	22 ± 3 (0,8)	25 ± 4 (1,0)
	6,0	165 ± 6 (1,3)*	168 ± 5 (1,0)	25 ± 3 (0,9)	25 ± 2 (1,0)
	12,0	177 ± 2 (1,4)**	170 ± 2 (1,0)	24 ± 3 (0,9)	31 ± 2 (1,2)
24C	0	128 ± 8	162 ± 6	27 ± 2	26 ± 1
	1,5	169 ± 16 (1,3)*	178 ± 14 (1,1)	25 ± 3 (0,9)	25 ± 2 (1,0)
	3,0	167 ± 14 (1,3)*	174 ± 12 (1,1)	26 ± 2 (1,0)	22 ± 2 (0,8)
	6,0	160 ± 11 (1,3)*	196 ± 5 (1,2)**	24 ± 4 (0,9)	26 ± 4 (1,0)
	12,0	144 ± 23 (1,1)	196 ± 5 (1,2)**	36 ± 5 (1,3)	25 ± 2 (1,0)
25C	0	170 ± 9	162 ± 6	27 ± 2	26 ± 1
	1,5	157 ± 1 (0,9)	171 ± 16 (1,1)	26 ± 5 (1,0)	24 ± 4 (0,9)
	3,0	163 ± 12 (1,0)	174 ± 12 (1,1)	28 ± 2 (1,0)	25 ± 2 (1,0)
	6,0	173 ± 9 (1,0)	193 ± 5 (1,2)**	20 ± 2 (0,7)	31 ± 3 (1,2)
	12,0	180 ± 1 (1,1)	196 ± 6 (1,2)**	25 ± 3 (0,9)	28 ± 6 (1,1)
26C	0	145 ± 14	144 ± 11	22 ± 4	22 ± 3
	1,5	157 ± 11 (1,1)	141 ± 21 (1,0)	27 ± 3 (1,2)	27 ± 2 (1,2)
	3,0	142 ± 11 (1,0)	207 ± 22 (1,4)*	23 ± 3 (1,0)	28 ± 4 (1,3)
	6,0	129 ± 2 (0,9)	199 ± 17 (1,4)*	22 ± 2 (1,0)	35 ± 2 (1,6)**
	12,0	146 ± 6 (1,0)	252 ± 12 (1,8)**	30 ± 1 (1,4)	37 ± 2 (1,7)**
27C	0	170 ± 9	144 ± 11	22 ± 4	22 ± 3
	1,5	177 ± 1 (1,0)	185 ± 7 (1,3)*	23 ± 1 (1,0)	28 ± 5 (1,3)
	3,0	182 ± 6 (1,1)	168 ± 5 (1,2)	31 ± 3 (1,4)	29 ± 2 (1,3)
	6,0	162 ± 4 (1,0)	200 ± 27 (1,4)	29 ± 1 (1,3)	35 ± 0 (1,6)**
	12,0	174 ± 4 (1,0)	200 ± 3 (1,4)**	27 ± 1 (1,2)	35 ± 2 (1,6)**
29C	0	136 ± 4	144 ± 11	23 ± 5	21 ± 1
	1,5	132 ± 3 (1,0)	142 ± 12 (1,0)	25 ± 1 (1,1)	20 ± 1 (1,0)
	3,0	133 ± 12 (1,0)	143 ± 7 (1,0)	27 ± 3 (1,2)	24 ± 2 (1,1)
	6,0	134 ± 15 (1,0)	146 ± 18 (1,0)	30 ± 2 (1,3)	27 ± 2 (1,3)*
	12,0	133 ± 9 (1,0)	154 ± 17 (1,1)	32 ± 2 (1,4)	29 ± 3 (1,4)*
30C	0	125 ± 2	116 ± 5	28 ± 3	21 ± 1
	1,5	147 ± 10 (1,2)*	115 ± 2 (1,0)	25 ± 2 (0,9)	26 ± 4 (1,2)
	3,0	155 ± 8 (1,2)*	120 ± 14 (1,0)	29 ± 1 (1,0)	31 ± 3 (1,5)**
	6,0	168 ± 8 (1,3)**	120 ± 18 (1,0)	34 ± 3 (1,2)	38 ± 3 (1,8)**
	12,0	175 ± 5 (1,4)**	128 ± 5 (1,1)	37 ± 2 (1,3)*	33 ± 3 (1,6)*
32C	0	125 ± 2	116 ± 5	28 ± 3	21 ± 1
	1,5	112 ± 17 (0,9)	112 ± 3 (1,0)	24 ± 2 (0,9)	24 ± 3 (1,1)
	3,0	99 ± 5 (0,8)	137 ± 10 (1,2)	32 ± 4 (1,1)	25 ± 2 (1,2)
	6,0	117 ± 22 (0,9)	115 ± 6 (1,0)	26 ± 3 (0,9)	27 ± 1 (1,3)**
	12,0	73 ± 55 (0,6)	118 ± 7 (1,0)	31 ± 2 (1,1)	29 ± 2 (1,4)**
Controle +		1184 ± 111	1920 ± 68	1608 ± 99	1720 ± 244

continuação

Código da amostra	mL equivalente de urina/placa	N° de colônias revertentes his+/placa, M ± SD (RM)			
		TA100		YG1024	
		-S9	+S9	-S9	+S9
33C	0	125 ± 2	116 ± 5	28 ± 3	21 ± 1
	1,5	142 ± 6 (1,1)*	112 ± 13 (1,0)	30 ± 3 (1,1)	30 ± 2 (1,4)**
	3,0	142 ± 13 (1,1)	120 ± 11 (1,0)	34 ± 2 (1,2)	32 ± 4 (1,5)*
	6,0	150 ± 7 (1,2)*	126 ± 17 (1,1)	34 ± 2 (1,2)	34 ± 5 (1,6)*
	12,0	136 ± 1 (1,1)	80 ± 18 (0,7)	31 ± 2 (1,1)	35 ± 2 (1,7)**
34C	0	125 ± 2	116 ± 6	28 ± 3	21 ± 1
	1,5	106 ± 4 (0,8)	118 ± 8 (1,0)	28 ± 2 (1,0)	27 ± 4 (1,3)
	3,0	94 ± 8 (0,8)	121 ± 11 (1,0)	34 ± 4 (1,2)	27 ± 1 (1,3)*
	6,0	140 ± 8 (1,1)	115 ± 7 (1,0)	38 ± 4 (1,4)*	30 ± 2 (1,4)**
	12,0	144 ± 13 (1,2)	118 ± 12 (1,0)	38 ± 2 (1,4)*	30 ± 1 (1,4)**
35C	0	125 ± 12	128 ± 7	21 ± 3	31 ± 4
	1,5	143 ± 10 (1,1)	211 ± 76 (1,6)	25 ± 6 (1,2)	32 ± 4 (1,0)
	3,0	126 ± 9 (1,0)	149 ± 8 (1,2)	19 ± 2 (0,9)	31 ± 3 (1,0)
	6,0	158 ± 6 (1,3)*	189 ± 17 (1,5)*	21 ± 2 (1,0)	33 ± 3 (1,1)
	12,0	150 ± 13 (1,2)	160 ± 19 (1,3)	21 ± 1 (1,0)	38 ± 9 (1,2)
36C	0	125 ± 12	128 ± 7	27 ± 2	31 ± 4
	1,5	121 ± 8 (1,0)	131 ± 3 (1,0)	48 ± 7 (1,8)*	27 ± 1 (0,9)
	3,0	129 ± 5 (1,0)	145 ± 20 (1,1)	52 ± 7 (1,9)*	35 ± 9 (1,1)
	6,0	115 ± 16 (0,9)	148 ± 19 (1,2)	55 ± 7 (2,0)**	39 ± 1 (1,3)
	12,0	114 ± 13 (0,9)	138 ± 2 (1,1)	43 ± 5 (1,6)*	43 ± 7 (1,4)
37C	0	144 ± 11	136 ± 4	19 ± 1	21 ± 2
	1,5	155 ± 20 (1,1)	122 ± 14 (0,9)	21 ± 1 (1,1)	23 ± 1 (1,1)
	3,0	151 ± 22 (1,0)	142 ± 6 (1,0)	21 ± 1 (1,1)	24 ± 2 (1,1)
	6,0	177 ± 23 (1,2)	146 ± 14 (1,1)	22 ± 1 (1,2)	28 ± 1 (1,3)*
	12,0	137 ± 14 (1,0)	136 ± 42 (1,0)	22 ± 2 (1,2)	21 ± 1 (1,0)
38C	0	125 ± 12	136 ± 4	27 ± 2	31 ± 4
	1,5	116 ± 7 (0,9)	132 ± 4 (1,0)	52 ± 6 (1,9)*	29 ± 4 (0,9)
	3,0	115 ± 4 (0,9)	133 ± 8 (1,0)	46 ± 5 (1,7)*	29 ± 4 (0,9)
	6,0	128 ± 3 (1,0)	146 ± 17 (1,1)	42 ± 8 (1,6)	32 ± 2 (1,0)
	12,0	133 ± 10 (1,1)	130 ± 9 (1,0)	42 ± 12 (1,6)	27 ± 3 (0,9)
39C	0	144 ± 11	136 ± 4	19 ± 1	21 ± 2
	1,5	146 ± 4 (1,0)	136 ± 4 (1,0)	22 ± 1 (1,2)	25 ± 3 (1,2)
	3,0	149 ± 4 (1,0)	135 ± 2 (1,0)	23 ± 3 (1,2)	25 ± 4 (1,2)
	6,0	151 ± 2 (1,0)	141 ± 13 (1,0)	21 ± 2 (1,1)	29 ± 1 (1,4)*
	12,0	155 ± 4 (1,1)	133 ± 12 (1,0)	21 ± 1 (1,1)	27 ± 2 (1,3)
Controle +		1010 ± 12	2033 ± 81	1240 ± 107	1034 ± 60

0 : controle negativo = 50µL DMSO

Controle positivo : -S9 → 10,0 µg/placa de 4-nitro-o-fenilenediamina para a YG1024 e 1,25µg/placa de azida sódica para a TA100 ; +S9 → 0,63µg/placa de 2-antramina

\* significância a 5%; \*\* significância a 1% (ANOVA).

**Tabela 5:** Atividade mutagênica expressa pela média (M) e desvio padrão (SD) do número de revertentes/placa e razão de mutagenicidade (RM) dos extratos orgânicos de urina do grupo exposto (E), nas diferentes doses, utilizando-se as linhagens TA100 e YG1024 tanto na presença (+S9) quanto na ausência (-S9) de ativação metabólica.

Código da amostra	mL equivalente de urina/placa	N° de colônias revertentes his+/placa, M ± SD (RM)			
		TA100		YG1024	
		-S9	+S9	-S9	+S9
02E	0	170 ± 9	138 ± 12	29 ± 9	23 ± 2
	1,5	168 ± 4 (1,0)	138 ± 25 (1,0)	24 ± 1 (0,8)	35 ± 5 (1,5)*
	3,0	186 ± 4 (1,1)	158 ± 8 (1,1)	23 ± 1 (0,8)	52 ± 4 (2,3)**
	6,0	182 ± 5 (1,1)	130 ± 5 (0,9)	25 ± 4 (0,9)	48 ± 3 (2,1)**
	12,0	185 ± 24 (1,1)	163 ± 20 (1,2)	29 ± 1 (1,0)	33 ± 1 (1,4)**
06E	0	125 ± 12	128 ± 7	21 ± 3	18 ± 3
	1,5	143 ± 8 (1,1)	144 ± 16 (1,1)	23 ± 3 (1,1)	17 ± 2 (0,9)
	3,0	117 ± 6 (0,9)	149 ± 24 (1,2)	24 ± 1 (1,1)	21 ± 6 (1,2)
	6,0	133 ± 13 (1,1)	181 ± 23 (1,4)	25 ± 1 (1,2)	25 ± 6 (1,4)
	12,0	129 ± 5 (1,0)	79 ± 9 (0,6)	17 ± 2 (0,8)	17 ± 1 (0,9)
07E	0	168 ± 4	138 ± 12	29 ± 9	23 ± 2
	1,5	173 ± 9 (1,0)	135 ± 13 (1,0)	29 ± 4 (1,0)	28 ± 3 (1,2)
	3,0	194 ± 7 (1,2)*	138 ± 17 (1,0)	26 ± 5 (0,9)	36 ± 3 (1,6)**
	6,0	190 ± 8 (1,1)*	151 ± 5 (1,1)	26 ± 4 (0,9)	32 ± 4 (1,4)*
	12,0	191 ± 20 (1,1)	137 ± 8 (1,0)	31 ± 4 (1,1)	33 ± 6 (1,4)
09E	0	177 ± 5	138 ± 12	29 ± 9	23 ± 2
	1,5	135 ± 13 (0,8)	144 ± 10 (1,0)	26 ± 2 (0,9)	46 ± 5 (2,0)**
	3,0	124 ± 10 (0,7)	117 ± 18 (0,8)	28 ± 5 (1,0)	38 ± 4 (1,7)**
	6,0	120 ± 13 (0,7)	147 ± 16 (1,1)	29 ± 4 (1,0)	51 ± 4 (2,2)**
	12,0	130 ± 8 (0,7)	100 ± 9 (0,7)	31 ± 5 (1,1)	39 ± 3 (1,7)**
10E	0	168 ± 4	138 ± 12	29 ± 9	23 ± 2
	1,5	134 ± 13 (0,8)	133 ± 17 (1,0)	26 ± 2 (0,9)	37 ± 4 (1,6)**
	3,0	171 ± 33 (1,0)	149 ± 16 (1,1)	25 ± 3 (0,9)	40 ± 5 (1,7)**
	6,0	142 ± 23 (0,8)	145 ± 11 (1,1)	28 ± 3 (1,0)	31 ± 1 (1,3)**
	12,0	166 ± 12 (1,0)	141 ± 10 (1,0)	27 ± 4 (0,9)	43 ± 3 (1,9)**
16E	0	144 ± 18	139 ± 5	21 ± 4	23 ± 2
	1,5	173 ± 7 (1,2)	154 ± 17 (1,1)	21 ± 1 (1,0)	39 ± 4 (1,7)**
	3,0	150 ± 10 (1,0)	133 ± 16 (1,0)	24 ± 4 (1,1)	38 ± 6 (1,7)*
	6,0	148 ± 6 (1,0)	139 ± 7 (1,0)	23 ± 2 (1,1)	37 ± 4 (1,6)*
	12,0	165 ± 9 (1,1)	155 ± 6 (1,1)	26 ± 3 (1,2)	35 ± 4 (1,5)*
17E	0	129 ± 8	162 ± 6	27 ± 2	26 ± 2
	1,5	150 ± 43 (1,2)	157 ± 45 (1,0)	25 ± 4 (0,9)	27 ± 2 (1,0)
	3,0	185 ± 10 (1,4)**	192 ± 11 (1,2)*	25 ± 5 (0,9)	30 ± 2 (1,2)
	6,0	191 ± 7 (1,5)**	176 ± 10 (1,1)	20 ± 2 (0,7)	28 ± 3 (1,1)
	12,0	194 ± 3 (1,5)**	210 ± 10 (1,3)**	25 ± 3 (0,9)	29 ± 1 (1,1)
Controle +		1944 ± 43	1950 ± 64	1521 ± 106	1911 ± 62

continuação

Código da amostra	mL equivalente de urina/placa	N° de colônias revertentes his+/placa, M ± SD (RM)			
		<u>TA100</u>		<u>YG1024</u>	
		-S9	+S9	-S9	+S9
18E	0	159 ± 17	136 ± 7	25 ± 2	38 ± 6
	1,5	158 ± 20 (1,0)	139 ± 12 (1,0)	20 ± 1 (0,8)	39 ± 3 (1,0)
	3,0	154 ± 7 (1,0)	126 ± 5 (0,9)	21 ± 3 (0,8)	34 ± 10 (0,9)
	6,0	203 ± 12 (1,3)	106 ± 18 (0,8)	27 ± 2 (1,1)	30 ± 6 (0,8)
	12,0	187 ± 2 (1,2)	115 ± 8 (0,8)	30 ± 5 (1,2)	17 ± 5 (0,4)
19E	0	168 ± 4	138 ± 11	29 ± 9	23 ± 2
	1,5	181 ± 24 (1,1)	155 ± 8 (1,1)	29 ± 6 (1,0)	28 ± 7 (1,2)
	3,0	173 ± 19 (1,0)	132 ± 16 (1,0)	31 ± 5 (1,1)	31 ± 6 (1,3)
	6,0	156 ± 17 (0,9)	121 ± 10 (0,9)	30 ± 5 (1,0)	37 ± 3 (1,6)**
	12,0	177 ± 6 (1,1)	95 ± 16 (0,7)	31 ± 2 (1,1)	34 ± 2 (1,5)**
23E	0	145 ± 14	146 ± 11	22 ± 4	22 ± 3
	1,5	216 ± 30 (1,5)*	137 ± 15 (0,9)	22 ± 2 (1,0)	25 ± 3 (1,1)
	3,0	264 ± 13 (1,8)**	153 ± 22 (1,0)	23 ± 1 (1,0)	29 ± 1 (1,3)*
	6,0	260 ± 25 (1,8)**	179 ± 23 (1,2)	27 ± 2 (1,2)	31 ± 2 (1,4)*
	12,0	185 ± 27 (1,3)	137 ± 12 (0,9)	35 ± 4 (1,6)*	24 ± 3 (1,1)
26E	0	144 ± 18	139 ± 5	21 ± 4	23 ± 2
	1,5	134 ± 8 (0,9)	149 ± 3 (1,1)	22 ± 3 (1,0)	37 ± 4 (1,6)**
	3,0	130 ± 8 (0,9)	146 ± 31 (1,1)	22 ± 2 (1,0)	35 ± 4 (1,5)*
	6,0	143 ± 21 (1,0)	134 ± 23 (1,0)	23 ± 2 (1,1)	41 ± 8 (1,8)*
	12,0	150 ± 5 (1,0)	149 ± 19 (1,1)	29 ± 1 (1,4)	37 ± 5 (1,6)**
27E	0	168 ± 4	144 ± 11	19 ± 3	22 ± 1
	1,5	171 ± 137 (1,0)	155 ± 9 (1,1)	25 ± 5 (1,3)	32 ± 2 (1,5)*
	3,0	174 ± 11 (1,0)	169 ± 22 (1,2)	26 ± 8 (1,4)	36 ± 5 (1,6)
	6,0	172 ± 15 (1,0)	228 ± 17 (1,6)**	28 ± 4 (1,5)	34 ± 6 (1,5)
	12,0	184 ± 9 (1,1)	151 ± 20 (1,0)	19 ± 2 (1,0)	37 ± 1 (1,7)**
28E	0	144 ± 18	139 ± 5	25 ± 4	21 ± 3
	1,5	142 ± 5 (1,0)	151 ± 5 (1,1)	30 ± 5 (1,2)	32 ± 4 (1,5)*
	3,0	152 ± 1 (1,1)	142 ± 5 (1,0)	28 ± 6 (1,1)	30 ± 3 (1,4)*
	6,0	153 ± 26 (1,1)	150 ± 11 (1,1)	18 ± 3 (0,7)	31 ± 4 (1,5)*
	12,0	149 ± 7 (1,0)	157 ± 9 (1,1)	25 ± 2 (1,0)	32 ± 3 (1,5)*
29E	0	159 ± 17	136 ± 7	25 ± 2	38 ± 6
	1,5	159 ± 15 (1,0)	140 ± 7 (1,0)	29 ± 4 (1,2)	40 ± 4 (1,1)
	3,0	154 ± 27 (1,0)	172 ± 12 (1,3)*	30 ± 8 (1,2)	45 ± 9 (1,2)
	6,0	155 ± 7 (1,0)	80 ± 17 (0,6)	29 ± 5 (1,2)	49 ± 11 (1,3)
	12,0	178 ± 7 (1,1)	99 ± 6 (0,7)	27 ± 3 (1,1)	33 ± 9 (0,9)
30E	0	144 ± 11	136 ± 4	19 ± 1	21 ± 2
	1,5	146 ± 9 (1,0)	141 ± 9 (1,0)	24 ± 1 (1,3)*	29 ± 2 (1,4)*
	3,0	146 ± 3 (1,0)	150 ± 17 (1,1)	24 ± 2 (1,3)*	32 ± 2 (1,5)**
	6,0	150 ± 2 (1,0)	146 ± 9 (1,1)	25 ± 5 (1,3)	29 ± 2 (1,4)*
	12,0	132 ± 17 (0,9)	141 ± 28 (1,0)	29 ± 1 (1,5)**	30 ± 4 (1,4)
Controle +		1944 ± 43	1950 ± 64	1521 ± 106	1911 ± 62

continuação

Código da amostra	mL equivalente de urina/placa	N° de colônias revertentes his+/placa. M ± SD (RM)			
		<u>TA100</u>		<u>YG1024</u>	
		-S9	+S9	-S9	+S9
31E	0	134 ± 17	110 ± 8	21 ± 3	18 ± 3
	1,5	131 ± 1 (1,0)	154 ± 12 (1,4)*	18 ± 2 (0,9)	26 ± 4 (1,4)
	3,0	136 ± 4 (1,0)	129 ± 4 (1,2)	22 ± 3 (1,0)	25 ± 2 (1,4)*
	6,0	139 ± 1 (1,0)	159 ± 2 (1,4)**	28 ± 1 (1,3)*	25 ± 4 (1,4)
	12,0	131 ± 3 (1,0)	171 ± 5 (1,6)**	29 ± 1 (1,4)*	26 ± 3 (1,4)*
33E	0	144 ± 18	139 ± 5	21 ± 4	21 ± 3
	1,5	147 ± 9 (1,0)	125 ± 21 (0,9)	24 ± 2 (1,1)	30 ± 3 (1,4)
	3,0	153 ± 17 (1,1)	142 ± 17 (1,0)	26 ± 1 (1,2)	25 ± 3 (1,2)
	6,0	134 ± 9 (0,9)	150 ± 10 (1,1)	26 ± 6 (1,2)	22 ± 3 (1,0)
	12,0	103 ± 12 (0,7)	129 ± 2 (0,9)	29 ± 8 (1,4)	32 ± 2 (1,5)*
35E	0	125 ± 20	107 ± 2	25 ± 4	21 ± 3
	1,5	150 ± 6 (1,2)	115 ± 6 (1,1)	20 ± 5 (0,8)	25 ± 4 (1,2)
	3,0	135 ± 21 (1,1)	121 ± 4 (1,1)	27 ± 5 (1,1)	24 ± 3 (1,1)
	6,0	142 ± 9 (1,1)	131 ± 2 (1,2)**	29 ± 4 (1,2)	30 ± 1 (1,4)*
	12,0	142 ± 5 (1,1)	139 ± 1 (1,3)**	32 ± 3 (1,3)	30 ± 4 (1,4)
36E	0	170 ± 9	145 ± 14	22 ± 4	22 ± 3
	1,5	183 ± 5 (1,1)	207 ± 8 (1,4)**	25 ± 3 (1,1)	27 ± 3 (1,2)
	3,0	192 ± 3 (1,1)	211 ± 17 (1,5)*	26 ± 2 (1,2)	25 ± 1 (1,1)
	6,0	181 ± 2 (1,1)	272 ± 26 (1,9)**	23 ± 3 (1,0)	35 ± 2 (1,6)**
	12,0	156 ± 2 (0,9)	255 ± 26 (1,8)**	24 ± 3 (1,1)	38 ± 2 (1,7)**
38E	0	125 ± 20	107 ± 2	25 ± 4	22 ± 1
	1,5	127 ± 20 (1,0)	97 ± 3 (0,9)	25 ± 5 (1,0)	29 ± 1 (1,3)*
	3,0	126 ± 4 (1,0)	116 ± 3 (1,1)*	32 ± 1 (1,3)	25 ± 4 (1,1)*
	6,0	146 ± 5 (1,2)	69 ± 3 (0,6)	29 ± 3 (1,2)	30 ± 1 (1,4)
	12,0	191 ± 8 (1,5)*	66 ± 3 (0,6)	41 ± 4 (1,6)*	29 ± 1 (1,3)
39E	0	117 ± 1	151 ± 16	32 ± 1	27 ± 1
	1,5	97 ± 7 (0,8)	159 ± 18 (1,1)	26 ± 1 (0,8)	55 ± 2 (2,0)**
	3,0	117 ± 11 (1,0)	135 ± 8 (0,9)	32 ± 2 (1,0)	70 ± 2 (2,6)**
	6,0	176 ± 1 (1,5)**	160 ± 27 (1,1)	45 ± 1 (1,4)**	88 ± 3 (3,3)**
	12,0	175 ± 8 (1,5)*	154 ± 16 (1,0)	37 ± 2 (1,2)	73 ± 3 (2,7)**
40E	0	170 ± 9	103 ± 6	19 ± 2	27 ± 1
	1,5	193 ± 3 (1,1)	126 ± 4 (1,2)*	22 ± 2 (1,2)	49 ± 2 (1,8)**
	3,0	198 ± 6 (1,2)	132 ± 4 (1,3)**	26 ± 3 (1,4)*	57 ± 2 (2,1)**
	6,0	204 ± 16 (1,2)	143 ± 21 (1,4)	25 ± 3 (1,3)	55 ± 4 (2,0)**
	12,0	193 ± 14 (1,1)	120 ± 9 (1,2)	34 ± 4 (1,8)**	71 ± 3 (2,6)**
43E	0	134 ± 17	110 ± 8	21 ± 3	18 ± 3
	1,5	158 ± 4 (1,2)	132 ± 2 (1,2)*	19 ± 2 (0,9)	20 ± 6 (1,1)
	3,0	131 ± 7 (1,0)	133 ± 3 (1,2)*	19 ± 2 (0,9)	21 ± 4 (1,2)
	6,0	135 ± 19 (1,0)	127 ± 2 (1,2)	18 ± 1 (0,9)	23 ± 3 (1,3)
	12,0	146 ± 12 (1,1)	148 ± 15 (1,3)*	21 ± 2 (1,0)	21 ± 2 (1,2)
Controle +		1767 ± 106	1918 ± 51	1917 ± 16	1720 ± 299

continuação

Código da amostra	mL equivalente de urina/placa	N° de colônias revertentes his+/placa. M ± SD (RM)			
		TA100		YG1024	
		-S9	+S9	-S9	+S9
44E	0	145 ± 14	144 ± 11	26 ± 4	22 ± 3
	1,5	140 ± 18 (1,0)	233 ± 14 (1,6)**	26 ± 2 (1,0)	24 ± 2 (1,1)
	3,0	137 ± 13 (0,9)	198 ± 11 (1,4)*	23 ± 2 (0,9)	29 ± 1 (1,3)*
	6,0	166 ± 11 (1,1)	190 ± 8 (1,3)*	21 ± 2 (0,8)	36 ± 1 (1,6)**
	12,0	184 ± 7 (1,3)	207 ± 13 (1,4)*	26 ± 3 (1,0)	43 ± 1 (2,0)**
45E	0	145 ± 14	144 ± 11	22 ± 4	22 ± 3
	1,5	167 ± 25 (1,2)	183 ± 32 (1,3)	23 ± 1 (1,0)	29 ± 2 (1,3)*
	3,0	147 ± 6 (1,0)	135 ± 30 (0,9)	23 ± 2 (1,0)	34 ± 3 (1,5)*
	6,0	183 ± 16 (1,3)	184 ± 10 (1,3)*	25 ± 3 (1,1)	33 ± 2 (1,5)*
	12,0	180 ± 14 (1,2)*	158 ± 21 (1,1)	34 ± 2 (1,5)*	46 ± 6 (2,1)*
46E	0	125 ± 12	128 ± 7	21 ± 3	18 ± 3
	1,5	136 ± 15 (1,1)	125 ± 4 (1,0)	21 ± 2 (1,0)	24 ± 1 (1,3)*
	3,0	162 ± 17 (1,3)	154 ± 12 (1,2)	21 ± 3 (1,0)	29 ± 1 (1,6)**
	6,0	211 ± 25 (1,7)*	155 ± 12 (1,2)	20 ± 1 (1,0)	28 ± 4 (1,6)*
	12,0	234 ± 15 (1,9)**	173 ± 5 (1,4)**	18 ± 2 (0,9)	28 ± 4 (1,6)*
47E	0	134 ± 17	110 ± 8	21 ± 3	18 ± 3
	1,5	154 ± 5 (1,1)	144 ± 4 (1,3)**	21 ± 3 (1,0)	24 ± 3 (1,3)
	3,0	161 ± 10 (1,2)	128 ± 3 (1,2)	23 ± 3 (1,1)	26 ± 3 (1,4)*
	6,0	188 ± 11 (1,4)*	136 ± 8 (1,2)*	25 ± 4 (1,2)	21 ± 5 (1,2)
	12,0	177 ± 4 (1,3)*	151 ± 2 (1,4)**	18 ± 3 (0,9)	26 ± 4 (1,4)
48E	0	125 ± 12	128 ± 7	21 ± 3	18 ± 3
	1,5	135 ± 18 (1,1)	137 ± 17 (1,1)	24 ± 1 (1,1)	26 ± 3 (1,4)*
	3,0	137 ± 3 (1,1)	135 ± 9 (1,1)	24 ± 3 (1,1)	23 ± 3 (1,3)
	6,0	124 ± 3 (1,0)	134 ± 4 (1,0)	22 ± 1 (1,0)	24 ± 4 (1,3)
	12,0	124 ± 10 (1,0)	113 ± 10 (0,9)	17 ± 2 (0,8)	28 ± 3 (1,6)*
50E	0	134 ± 17	165 ± 10	21 ± 3	18 ± 3
	1,5	156 ± 6 (1,2)	160 ± 3 (1,0)	24 ± 2 (1,1)	23 ± 2 (1,3)
	3,0	138 ± 14 (1,0)	163 ± 3 (1,0)	23 ± 3 (1,1)	19 ± 3 (1,1)
	6,0	148 ± 4 (1,1)	177 ± 5 (1,1)	26 ± 3 (1,2)	26 ± 5 (1,4)
	12,0	135 ± 10 (1,0)	162 ± 11 (1,0)	27 ± 1 (1,3)	24 ± 3 (1,3)
54E	0	134 ± 17	110 ± 8	27 ± 2	31 ± 4
	1,5	144 ± 10 (1,1)	117 ± 9 (1,1)	50 ± 8 (1,9)*	38 ± 5 (1,2)
	3,0	122 ± 18 (0,9)	119 ± 9 (1,1)	48 ± 4 (1,8)**	34 ± 5 (1,1)
	6,0	143 ± 18 (1,1)	142 ± 2 (1,3)**	51 ± 4 (1,9)**	38 ± 6 (1,2)
	12,0	142 ± 9 (1,1)	123 ± 8 (1,1)	60 ± 6 (2,2)**	33 ± 3 (1,1)
Controle +		1767 ± 106	1918 ± 51	1917 ± 16	1720 ± 299

0 : controle negativo = 50µL DMSO

Controle positivo : -S9 → 10,0 µg/placa de 4-nitro-o-fenilenediamina para a YG1024 e 1,25µg/placa de azida sódica para a TA100 ; +S9 → 0,63µg/placa de 2-antramina

\* significância a 5%; \*\* significância a 1% (ANOVA).

**Tabela 6** : Atividade mutagênica expressa em potência (número de colônias revertentes his+/ mL equivalente urina), das amostras do grupo controle e exposto, com resposta mutagênica positiva em pelo menos um dos ensaios (TA100 ou YG1024, com (+S9) ou sem (-S9) ativação metabólica).

<b>Grupo controle</b>					<b>Grupo exposto</b>				
Cód.	TA100		YG1024		Cód.	TA100		YG1024	
	-S9	+S9	-S9	+S9		-S9	+S9	-S9	+S9
04C	2,3	0	0	0	02E	0	0	0	9,2
17C	19,2	0	0	0	09E	0	0	0	12,9
36C	0	0	13,8	0	39E	0	0	0	25,1
					40E	0	0	0	10,4
					44E	0	0	0	1,8
					45E	0	0	0	4,2
					54E	0	0	2,6	0

Cód.:código da amostra.



**Tabela 7:** Atividade mutagênica expressa pelo maior valor da razão de mutagenicidade (RM), nas amostras de urina do grupo controle e exposto, nas linhagens TA100 e YG1024 com (+S9) e sem (-S9) ativação metabólica.

Cód.	Grupo controle				Cód.	Grupo exposto			
	TA100		YG1024			TA100		YG1024	
	-S9	+S9	-S9	+S9		-S9	+S9	-S9	+S9
02C	1,0	1,1	1,3	1,2	02E	1,1	1,2	1,0	<b>2,3</b>
04C	<b>2,2</b>	1,5	1,5	1,4	06E	1,1	1,4	1,2	1,4
07C	1,2	1,2	1,2	1,1	07E	1,2	1,1	1,1	1,6
08C	1,0	1,2	1,2	1,4	09E	0,8	1,1	1,1	<b>2,2</b>
09C	0,8	1,2	1,1	1,8	10E	1,0	1,1	1,0	1,9
11C	1,1	1,3	1,0	1,5	16E	1,2	1,1	1,2	1,7
13C	1,1	1,2	1,0	1,6	17E	1,5	1,3	0,9	1,2
14C	1,1	1,0	1,0	1,2	18E	1,3	1,0	1,2	1,0
16C	1,1	1,1	1,0	1,4	19E	1,1	1,1	1,1	1,6
17C	<b>2,5</b>	1,9	1,6	1,2	23E	1,8	1,2	1,6	1,4
18C	1,1	1,0	1,5	1,4	26E	1,0	1,1	1,4	1,8
19C	1,0	1,0	1,1	1,0	27E	1,1	1,6	1,5	1,7
20C	1,2	1,1	0,9	1,4	28E	1,1	1,1	1,2	1,5
21C	1,5	1,2	1,2	1,2	29E	1,1	1,3	1,2	1,3
22C	1,5	1,2	1,3	1,0	30E	1,0	1,1	1,5	1,5
23C	1,5	1,1	0,9	1,2	31E	1,0	1,6	1,4	1,4
24C	1,3	1,2	1,3	1,0	33E	1,1	1,1	1,4	1,5
25C	1,1	1,2	1,0	1,2	35E	1,2	1,3	1,3	1,4
26C	1,1	1,8	1,4	1,7	36E	1,1	1,9	1,2	1,7
27C	1,1	1,4	1,4	1,6	38E	1,5	1,1	1,6	1,4
29C	1,0	1,1	1,4	1,4	39E	1,5	1,1	1,4	<b>3,3</b>
30C	1,4	1,1	1,3	1,8	40E	1,2	1,4	1,8	<b>2,6</b>
32C	0,9	1,2	1,1	1,4	43E	1,2	1,3	1,0	1,3
33C	1,2	1,1	1,2	1,7	44E	1,3	1,6	1,0	<b>2,0</b>
34C	1,2	1,0	1,4	1,4	45E	1,3	1,3	1,5	<b>2,1</b>
35C	1,3	1,6	1,2	1,2	46E	1,9	1,4	1,0	1,6
36C	1,0	1,2	<b>2,0</b>	1,4	47E	1,4	1,4	1,2	1,4
37C	1,2	1,1	1,2	1,3	48E	1,1	1,1	1,1	1,6
38C	1,1	1,1	1,9	1,0	50E	1,2	1,1	1,3	1,4
39C	1,1	1,0	1,2	1,4	54E	1,1	1,3	<b>2,2</b>	1,2
M	1,2	1,2	1,3	1,4	M	1,2	1,3	1,3	1,7*

Cód.:código da amostra; M: média de RM; valores em negrito representam  $RM \geq 2,0$ .

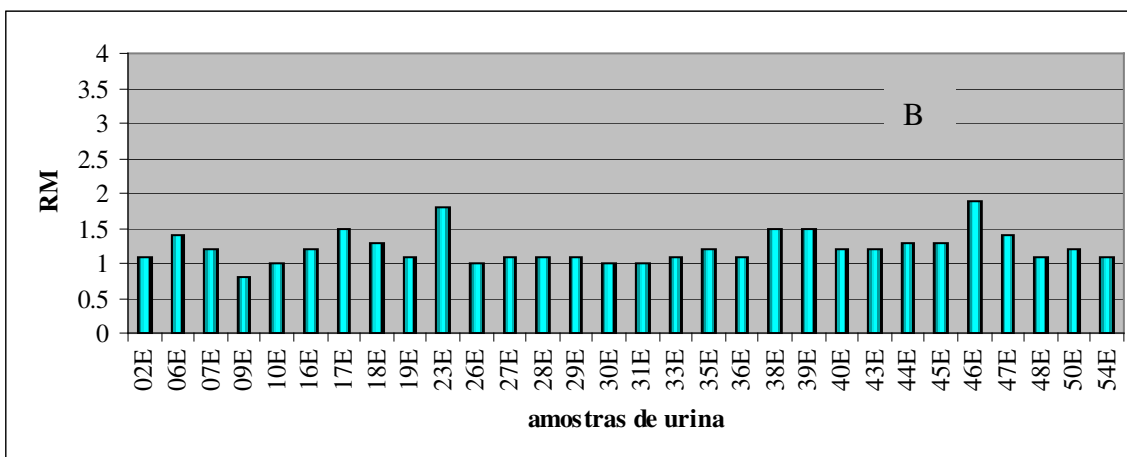
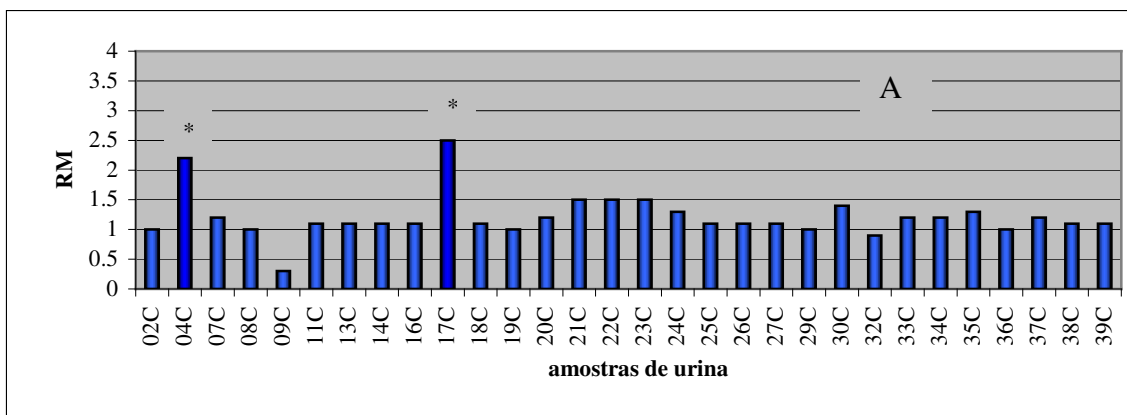
\*  $p < 0,05$  – Teste de Mann Whitney.

**Tabela 8:** Atividade mutagênica expressa pelo índice de aumento relativo no número de revertentes his+, das amostras de urina do grupo controle e exposto, nas linhagens TA100 e YG1024 com (+S9) e sem (-S9) ativação metabólica.

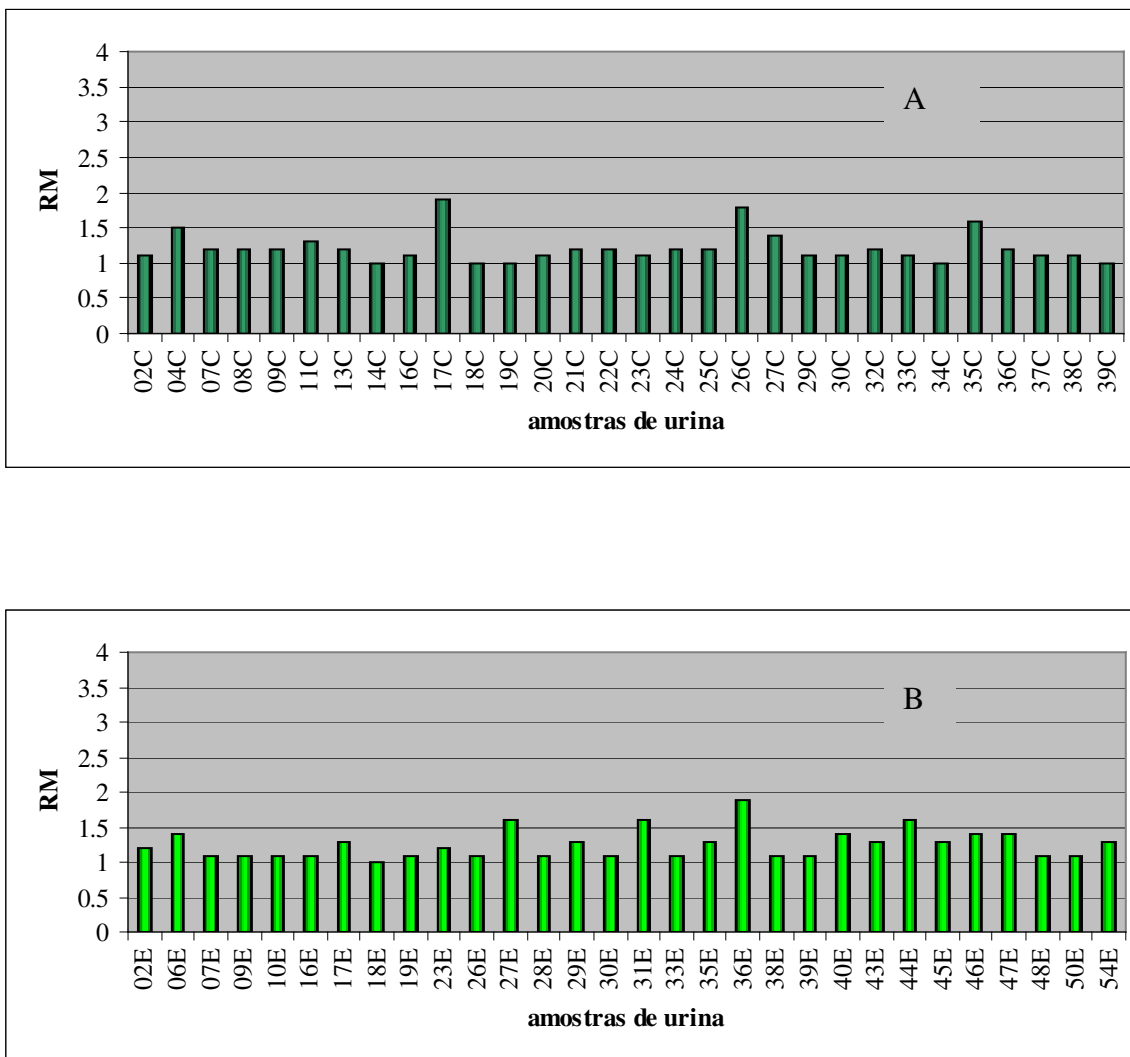
Cód.	Grupo controle				Cód.	Grupo exposto			
	TA100		YG1024			TA100		YG1024	
	-S9	+S9	-S9	+S9		-S9	+S9	-S9	+S9
02C	0,02	0,13	0,25	0,22	02E	0,09	0,18	0	1,3
04C	1,2	0,5	0,47	0,38	06E	0,14	0,41	0,19	1,22
07C	0,16	0,18	0,24	0,22	07E	0,15	0,09	0,07	0,57
08C	0,05	0,17	0,24	0,44	09E	0	0,07	0,07	1,22
09C	0	0,08	0,07	0,81	10E	0,02	0,08	0	0,87
11C	0,09	0,25	0,03	0,52	16E	0,2	0,12	0,24	0,7
13C	0,11	0,2	0,03	0,62	17E	0,5	0,3	0	0,15
14C	0,13	0,07	0	0,18	18E	0,28	0,02	0,2	0,03
16C	0,14	0,14	0,05	0,38	19E	0,14	0,12	0,07	0,61
17C	1,5	0,92	0,56	0,16	23E	0,45	0,23	0,59	0,41
18C	0,08	0,04	0,52	0,39	26E	0,04	0,07	0,38	0,78
19C	0,01	0,02	0,11	0	27E	0,1	0,58	0,47	0,68
20C	0,16	0,14	0	0,42	28E	0,06	0,13	0,2	0,52
21C	0,48	0,19	0,22	0,15	29E	0,12	0,26	0,2	0,29
22C	0,47	0,2	0,33	0	30E	0,04	0,1	0,53	0,52
23C	0,48	0,12	0	0,19	31E	0,04	0,55	0,38	0,44
24C	0,32	0,21	0,33	0	33E	0,06	0,08	0,38	0,52
25C	0,06	0,21	0,04	0,19	35E	0,2	0,3	0,28	0,43
26C	0,08	0,75	0,36	0,68	36E	0,13	0,88	0,18	0,73
27C	0,07	0,39	0,4	0,59	38E	0,17	0,08	0,64	0,36
29C	0	0,07	0,39	0,59	39E	0,34	0,07	0,41	2,26
30C	0,4	0,22	0,32	0,26	40E	0,2	0,39	0,8	1,63
32C	0	0,018	0,14	0,38	43E	0,18	0,35	0	0,28
33C	0,2	0,09	0,21	0,67	44E	0,27	0,62	0	0,95
34C	0,15	0,04	0,36	0,43	45E	0,26	0,28	0,55	1,09
35C	0,26	0,65	0,19	0,23	46E	0,87	0,35	0	0,61
36C	0,04	0,16	1,03	0,39	47E	0,4	0,24	0,19	0,31
37C	0,23	0,07	0,16	0,33	48E	0,1	0,07	0,14	0,56
38C	0,06	0,07	0,93	0,03	50E	0,16	0,07	0,29	0,31
39C	0,08	0,04	0,21	0,38	54E	0,07	0,29	1,02	0,23
M	0,2	0,2	0,3	0,4	M	0,2	0,2	0,3	0,7*

Cód.:código da amostra; M: média do índice de aumento relativo.

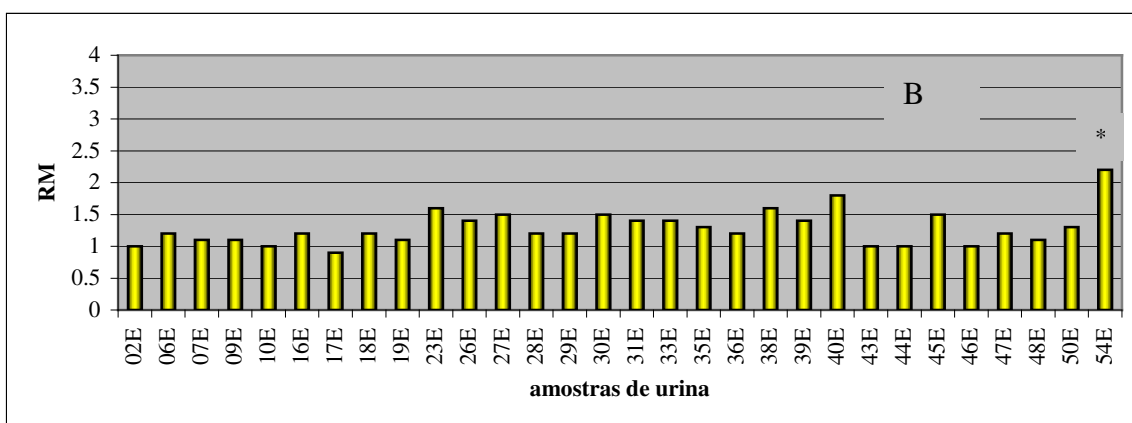
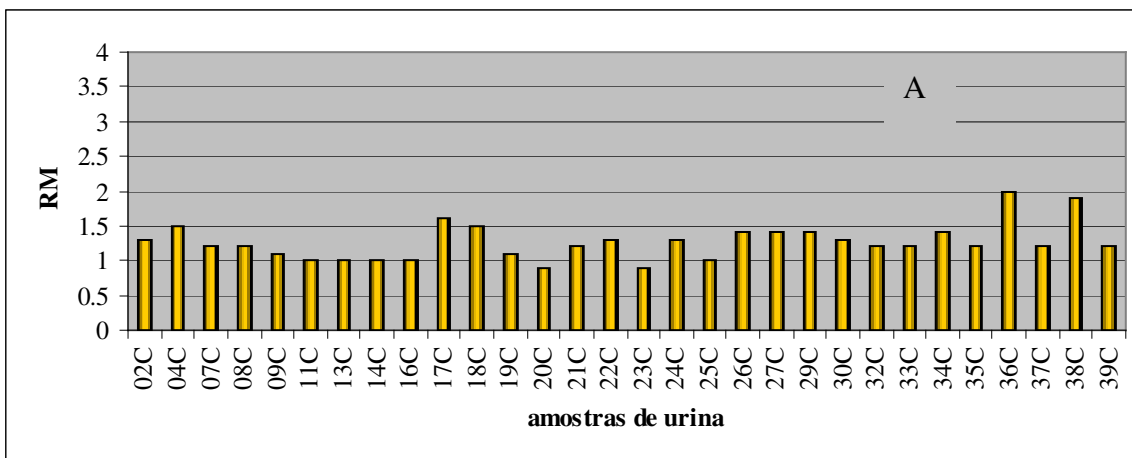
\*  $p < 0,05$  – Teste de Mann Whitney.



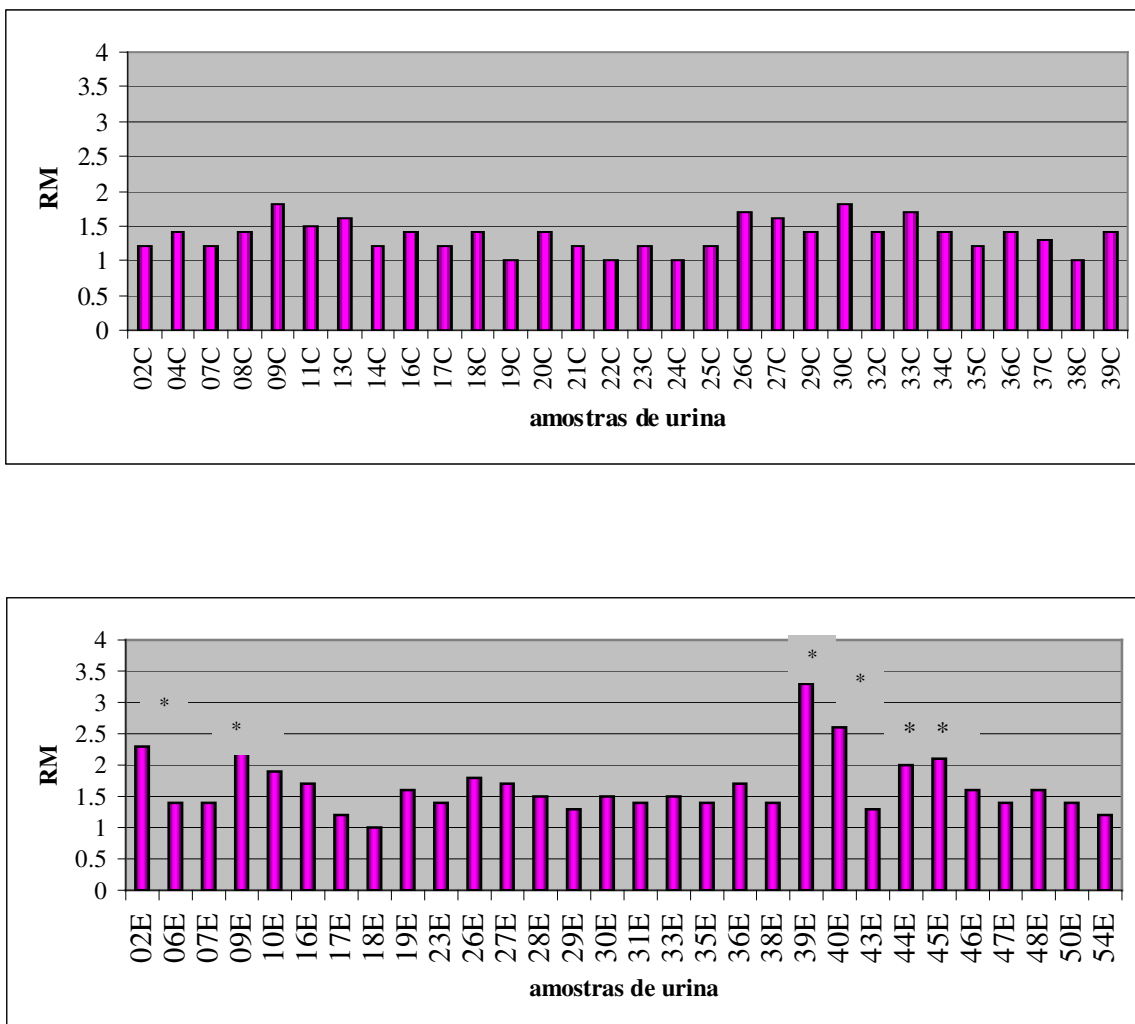
**Figura 2:** Razão de mutagenicidade (RM) das amostras de urina do grupo controle (A) e exposto (B), na linhagem de *S. typhimurium* TA100 sem ativação metabólica. \* amostras com atividade mutagênica positiva.



**Figura 3:** Razão de mutagenicidade (RM) das amostras de urina do grupo controle (A) e exposto (B), na linhagem de *S. typhimurium* TA100 com ativação metabólica.



**Figura 4:** Razão de mutagenicidade (RM) das amostras de urina do grupo controle (A) e exposto (B), na linhagem de *S. typhimurium* YG1024 sem ativação metabólica. \* amostras com atividade mutagênica positiva.

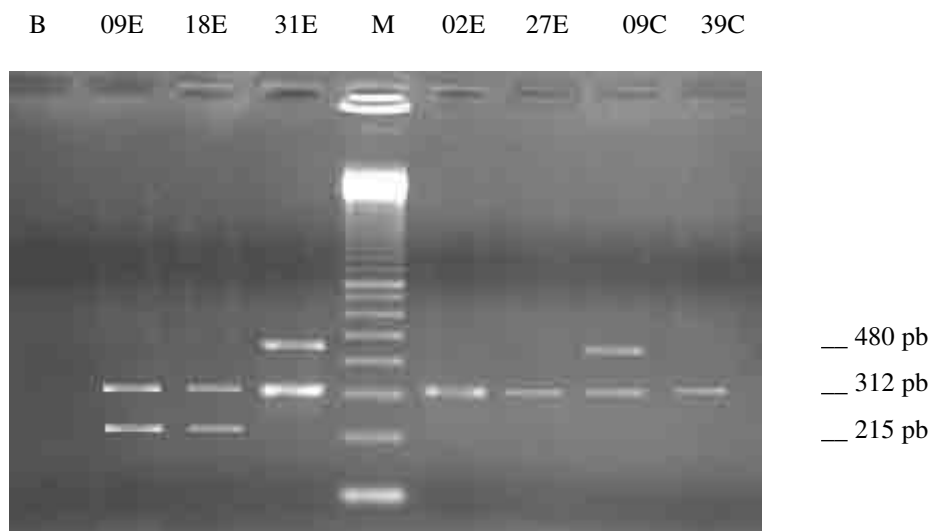


**Figura 5:** Razão de mutagenicidade (RM) das amostras de urina do grupo controle (A) e exposto (B), na linhagem de *S. typhimurium* YG1024 com ativação metabólica. \* amostras com atividade mutagênica positiva.

### 5.3. Distribuição das frequências dos diferentes polimorfismos estudados

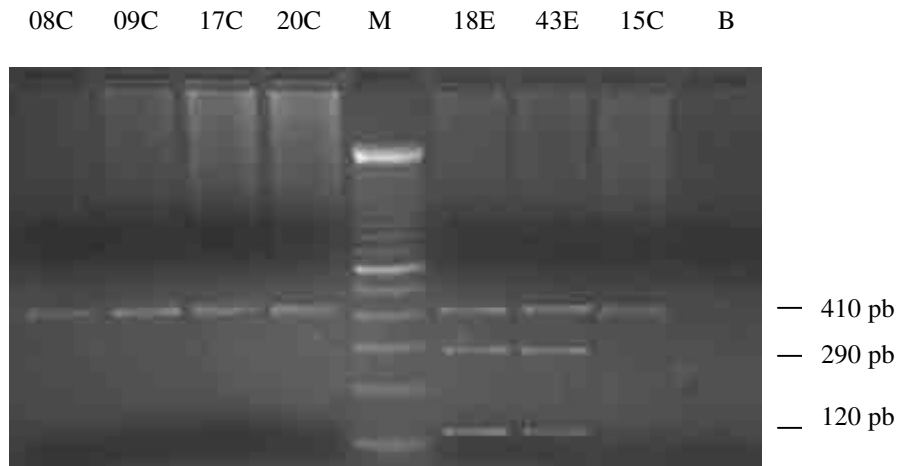
A amplificação por PCR do DNA para os genes *CYP2E1*, *GSTM1* e *GSTT1* foi realizada em amostras de sangue total dos indivíduos expostos a solventes orgânicos e seus respectivos controles.

O polimorfismo dos genes *GSTM1* e *GSTT1* é caracterizado pela deleção do gene. A Figura 6 mostra o polimorfismo das glutathiona-S-transferase mu e teta, onde podem ser detectados os alelos homozigotos nulos para os genes *GSTM1* e *GSTT1* por meio da técnica de PCR multiplex.



**FIGURA 6:** PCR multiplex para a detecção de alelos homozigotos nulos das glutathiona S-transferases M1 (*GSTM1*) e T1 (*GSTT1*), onde M = marcador de peso molecular (100 pb) e B = branco (todos os reagentes exceto o DNA). Os produtos de PCR de 215 e 480 pb correspondem à presença dos genes *GSTM1* e *GSTT1*, respectivamente. O fragmento 312 pb corresponde ao gene constante *CYP1A1*, o qual foi usado como controle interno da reação. Amostras 09E e 18E gene *GSTM1* presente; amostras 31E e 09C gene *GSTT1* presente; amostras 02E, 27E e 39C genes *GSTM1* e *GSTT1* ausentes.

A Figura 7 apresenta um perfil de PCR para o polimorfismo *CYP2E1* –*PstI*. O polimorfismo é caracterizado pela presença ou ausência do sítio para a enzima de restrição *PstI*.



**FIGURA 7:** PCR - RFLP para detecção do polimorfismo *CYP2E1* -PstI, onde M = marcador de peso molécula (100 pb) e B = branco (todos os reagentes exceto o DNA). Amostras 08C, 09C, 17C, 20C e 15C são homozigotos selvagens (c1/c1); amostras 18E e 43E são heterozigotos.

Com exceção de um indivíduo (23E), que por motivo de saúde, foi impossível coletar sua amostra de sangue, dos 59 indivíduos analisados, apenas 2 (18E e 43E) apresentaram genótipo heterozigoto para o *CYP2E1-PstI*. O genótipo mais freqüente foi o nulo para os genes da glutathiona S-transferase, aparecendo em 79,6% dos indivíduos analisados. A presença do gene *GSTM1* foi demonstrada apenas em 8,5% dos indivíduos (09E, 18E, 35E, 47E e 48E) todos pertencentes ao grupo exposto. O gene *GSTT1* foi observado em 11,9% dos voluntários (09C, 11C e 35C, 07E, 28E, 31E e 33E) (Tabela 9).

#### 5.4. Caracterização dos indivíduos analisados em relação a diferentes parâmetros

A Tabela 9 apresenta, as características das amostras avaliadas em relação à idade, sexo, grupo étnico, atividade mutagênica na urina e os polimorfismos dos genes *CYP2E1*, *GSTM1* e *GSTT1*. De um modo geral, pode-se dizer que as amostras foram compostas em sua maioria, por indivíduos do sexo feminino, pertencente ao grupo étnico caucasiano e com faixa



etária entre 19 e 54 anos. Dentre os 59 participantes desse estudo, observou-se a seguinte distribuição dos genótipos: 90% e 69% dos indivíduos do grupo controle e exposto (respectivamente) apresentaram genótipo *GSTM1/GSTT1* nulo; o genótipo *GSTM1* presente foi encontrado apenas no grupo exposto (17%); e o genótipo *GSTT1* presente foi encontrado em 10% e 14% dos indivíduos do grupo controle e exposto, respectivamente (Tabela 10).

Através do teste do  $\chi^2$  (qui-quadrado) não foi encontrada nenhuma dependência entre as variáveis, sexo, idade e etnia e a atividade mutagênica positiva. O teste de Mann-Whitney também não demonstrou nenhuma dependência entre o genótipo e atividade mutagênica positiva. No entanto, observou-se que das 10 amostras de urina com resposta mutagênica positiva, 9 amostras eram de indivíduos com genótipo *GSTM1/GSTT1* nulo e, apenas 1 amostra de urina de um indivíduo com o gene *GSTM1* presente.

Nesse estudo, foram observadas diferenças entre o grupo controle e exposto, porém sem significância estatística, na média dos índices de aumento relativo no número de revertentes his+, em indivíduos com genótipo *GSTM1/GSTT1* nulo. As amostras de urina dos indivíduos do grupo controle com genótipo *GSTM1/GSTT1* nulo apresentaram média dos índices de aumento relativo de 0,22; 0,18; 0,31 e 0,33; no grupo exposto esses valores foram de 0,21; 0,28; 0,30 e 0,78; em ensaios com as linhagens TA100 (-S9), TA100 (+S9), YG1024 (-S9) e YG1024 (+S9), respectivamente (Figura 8).

**Tabela 9:** Caracterização das amostras dos indivíduos dos grupos, controle e exposto, em relação à idade, sexo, grupo étnico, atividade mutagênica da urina e polimorfismos dos genes *CYP2E1*, *GSTT1* e *GSTM1*.

Código	Sexo M/F	Etnia	Idade (anos)	Atividade Mutagênica		<i>CYP2E1</i>	<i>GSTM1</i>	<i>GSTT1</i>
				TA100	YG1024			
02C	F	B	49	-/-	-/-	c1/c1	ausente	ausente
04C	F	B	43	+/-	-/-	c1/c1	ausente	ausente
07C	M	B	42	-/-	-/-	c1/c1	ausente	ausente
08C	F	B	29	-/-	-/-	c1/c1	ausente	ausente
09C	F	B	30	-/-	-/-	c1/c1	ausente	presente
11C	M	B	39	-/-	-/-	c1/c1	ausente	presente
13C	F	B	34	-/-	-/-	c1/c1	ausente	ausente
14C	F	B	22	-/-	-/-	c1/c1	ausente	ausente
16C	F	B	29	-/-	-/-	c1/c1	ausente	ausente
17C	F	B	19	+/-	-/-	c1/c1	ausente	ausente
18C	M	B	27	-/-	-/-	c1/c1	ausente	ausente
19C	M	B	20	-/-	-/-	c1/c1	ausente	ausente
20C	F	B	20	-/-	-/-	c1/c1	ausente	ausente
21C	M	B	22	-/-	-/-	c1/c1	ausente	ausente
22C	M	B	26	-/-	-/-	c1/c1	ausente	ausente
23C	M	B	25	-/-	-/-	c1/c1	ausente	ausente
24C	F	B	28	-/-	-/-	c1/c1	ausente	ausente
25C	F	B	20	-/-	-/-	c1/c1	ausente	ausente
26C	F	B	20	-/-	-/-	c1/c1	ausente	ausente
27C	F	B	42	-/-	-/-	c1/c1	ausente	ausente
29C	F	B	21	-/-	-/-	c1/c1	ausente	ausente
30C	F	P	19	-/-	-/-	c1/c1	ausente	ausente
32C	F	B	48	-/-	-/-	c1/c1	ausente	ausente
33C	M	B	25	-/-	-/-	c1/c1	ausente	ausente
34C	F	B	25	-/-	-/-	c1/c1	ausente	ausente
35C	M	B	23	-/-	-/-	c1/c1	ausente	presente
36C	M	P	33	-/-	+/-	c1/c1	ausente	ausente
37C	F	B	19	-/-	-/-	c1/c1	ausente	ausente
38C	F	B	19	-/-	-/-	c1/c1	ausente	ausente
39C	F	B	23	-/-	-/-	c1/c1	ausente	ausente
02E	F	B	35	-/-	-/+	c1/c1	ausente	ausente
06E	F	B	49	-/-	-/-	c1/c1	ausente	ausente
07E	M	B	27	-/-	-/-	c1/c1	ausente	presente
09E	F	B	30	-/-	-/+	c1/c1	presente	ausente
10E	M	B	32	-/-	-/-	c1/c1	ausente	ausente
16E	M	O	20	-/-	-/-	c1/c1	ausente	ausente
17E	F	B	31	-/-	-/-	c1/c1	ausente	ausente
18E	F	B	33	-/-	-/-	c1/c2	presente	ausente
19E	F	B	29	-/-	-/-	c1/c1	ausente	ausente
23E	F	B	38	-/-	-/-	ND	ND	ND
26E	F	B	23	-/-	-/-	c1/c1	ausente	ausente
27E	F	B	28	-/-	-/-	c1/c1	ausente	ausente
28E	F	B	23	-/-	-/-	c1/c1	ausente	presente
29E	F	B	26	-/-	-/-	c1/c1	ausente	ausente
30E	M	B	33	-/-	-/-	c1/c1	ausente	ausente
31E	F	B	54	-/-	-/-	c1/c1	ausente	presente
33E	F	B	22	-/-	-/-	c1/c1	ausente	presente

continuação

Código	Sexo M/F	Etnia	Idade (anos)	Atividade Mutagênica		<i>CYP2E1</i>	<i>GSTM1</i>	<i>GSTT1</i>
				TA100	YG1024			
35E	F	B	23	-/-	-/-	c1/c1	presente	ausente
36E	M	B	35	-/-	-/-	c1/c1	ausente	ausente
38E	M	N	27	-/-	-/-	c1/c1	ausente	ausente
39E	F	B	30	-/-	-/+	c1/c1	ausente	ausente
40E	F	B	32	-/-	-/+	c1/c1	ausente	ausente
43E	F	O	21	-/-	-/-	c1/c2	ausente	ausente
44E	M	B	20	-/-	-/-	c1/c1	ausente	ausente
45E	M	B	33	-/-	-/+	c1/c1	ausente	ausente
46E	F	B	23	-/-	-/-	c1/c1	ausente	ausente
47E	M	B	22	-/-	-/-	c1/c1	presente	ausente
48E	F	N	27	-/-	-/-	c1/c1	presente	ausente
50E	M	B	32	-/-	-/-	c1/c1	ausente	ausente
54E	F	B	22	-/-	+/-	c1/c1	ausente	ausente

C: amostra do grupo controle; E: amostra do grupo exposto; M: masculino; F: feminino; B: branco; N: negro; O: oriental; ND: não determinado; -/-: não apresentou atividade mutagênica com e sem ativação metabólica; +/-: atividade mutagênica apenas sem ativação metabólica; -/+ : atividade mutagênica apenas com ativação metabólica.

**Tabela 10:** Caracterização das amostras dos indivíduos dos grupos, controle e exposto, em relação à idade, sexo, e atividade mutagênica (diferentes parâmetros de avaliação) da urina e polimorfismos dos genes *CYP2E1*, *GSTT1* e *GSTM1*.

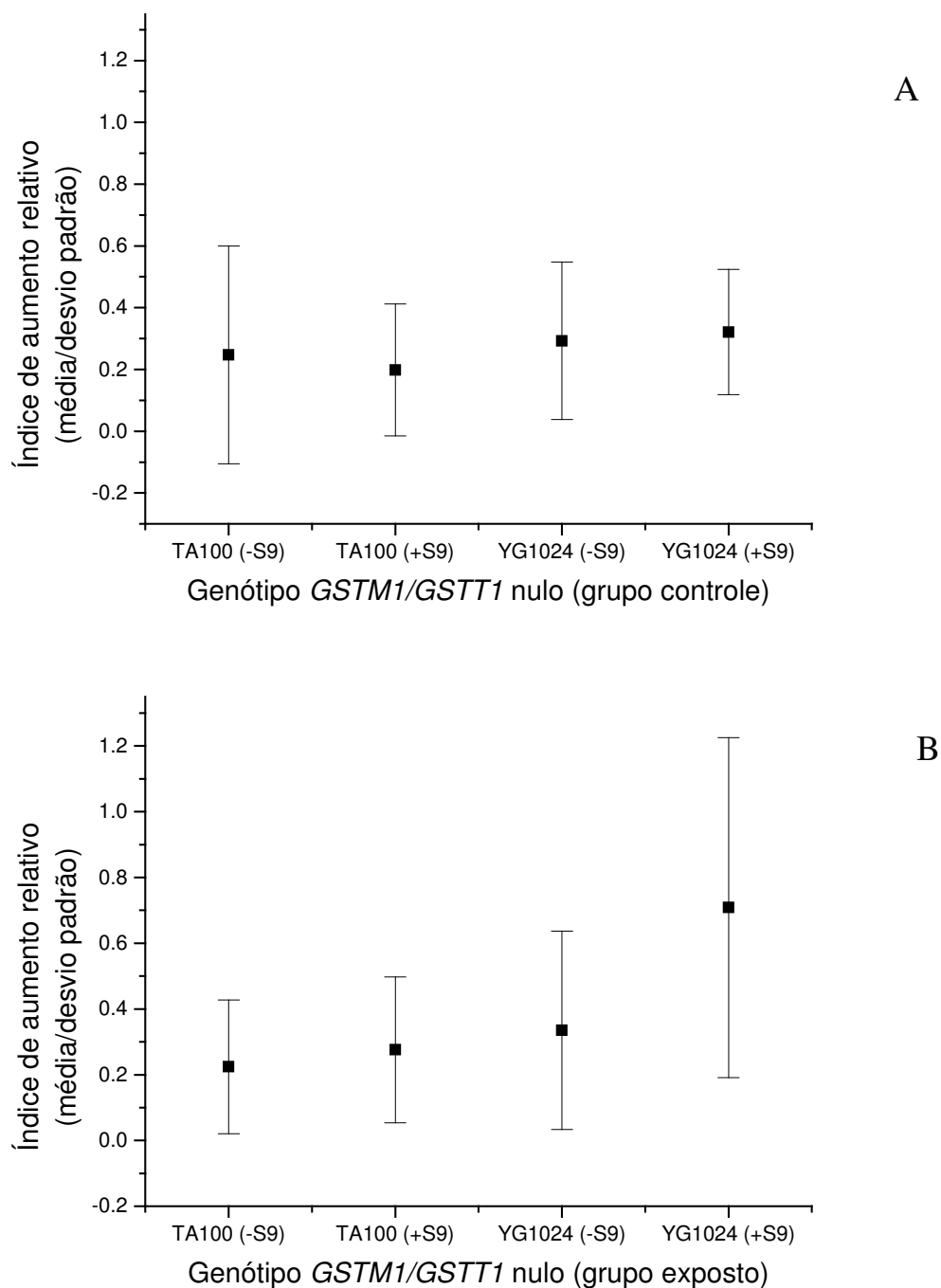
	GRUPO CONTROLE	GRUPO EXPOSTO
Número de indivíduos	30	30
Idade (média ± SD)	28 ± 9	29,3 ± 7,7
Variação	19 - 49	19 - 54
Sexo		
Feminino	20	20
Masculino	10	10
<i>GSTM1</i> e <i>GSTT1</i> ausentes	27 (90%)	20 (69%)
<i>GSTM1</i> presente	0	5 (17%)
<i>GSTT1</i> presente	3 (10%)	4 (14%)
<i>CYP2E1</i> selvagem	30 (100%)	27 (93,1%)
<i>CYP2E1</i> heterozigoto	0	2 (6,9%)
Índice de aumento relativo (média <sup>a</sup> )		
TA100 (-S9)	0,2	0,2
TA100 (+S9)	0,2	0,2
YG1024 (-S9)	0,3	0,3
YG1024 (+S9)	0,4	0,7*
Maior valor de RM (média <sup>b</sup> )		
TA100 (-S9)	1,2	1,2
TA100 (+S9)	1,2	1,3
YG1024 (-S9)	1,3	1,3
YG1024 (+S9)	1,4	1,7*

<sup>a</sup> O índice de aumento relativo no número de revertentes his+ foi calculado, subtraindo o maior n° revertentes his+ encontrado para cada amostra de urina, do n° revertentes his+ espontâneas, o valor obtido foi dividido pelo n° revertentes his+ espontâneas. A partir do índice de aumento relativo de cada amostra de urina, foi calculada a média para cada grupo (controle e exposto)

<sup>b</sup> A partir do valor de RM obtido para cada amostra de urina, foi calculada a média para cada grupo (controle e exposto).

-S9: sem metabolização; +S9: com metabolização; RM: razão de mutagenicidade.

\* p < 0,05 – Teste de Mann Whitney.



**Figura 8:** Média e desvio padrão dos índices de aumento relativo no número de revertentes his+, das amostras de urina dos indivíduos com genótipo *GSTM1/GSTT1* nulo, no grupo controle (A) e no exposto (B).

## 6. Discussão

### 6.1. Análise da mutagenicidade urinária

A mutagenicidade urinária tem sido muito usada como marcador de exposição ocupacional e ambiental a diferentes genotoxinas. Um aumento da mutagenicidade urinária foi demonstrado em fumantes (PAVANELLO & CONFLERO, 2000), após a ingestão de frituras (PAVANELLO *et al.*, 2002a), em pacientes sob tratamento medicamentoso (GABBANI *et al.*, 1999), e em exposição ocupacional a aminas aromáticas, HPA, solventes, etc. (VERMEULEN *et al.*, 2003; HANSEN *et al.*, 2004; SIMIOLI *et al.*, 2004).

A resina de troca não-iônica, Amberlit® - A2 (XAD-2), tem sido extensivamente usada nesses estudos de biomonitoramento de populações, para a concentração dos mutágenos presentes na urina avaliados em ensaios com *Samonella*/microsomo (YAMASAKI & AMES, 1977; GABBANI *et al.*, 1999; SMITH *et al.*, 2000, PAVANELLO *et al.*, 2002b; MOHAMADI *et al.*, 2003; VERMEULEN *et al.*, 2003). Por outro lado, André *et al.* (2002), compararam a eficiência da resina XAD-2 com a Bakerbond®-spe-SDB1, na concentração de amostras de urina utilizadas no teste de Ames, e observaram maior atividade mutagênica nos extratos concentrados pela Bakerbond. Apesar disso, no presente trabalho, foi

usada a resina XAD-2, por ser a mais amplamente utilizada, sendo possível observar a sua eficiência, através da atividade mutagênica detectada em várias amostras.

O teste de mutação gênica reversa em *Salmonella* (teste de Ames), detecta vários tipos de mutação de ponto, que envolve poucos pares de bases, em um genoma bacteriano simples (RIBEIRO *et al.*, 2003). A associação de várias linhagens, com sensibilidade específica a determinadas classes de substâncias e protocolos com metabolização, demonstram as classes químicas presentes na amostra, além de classificá-las em mutágenos diretos ou indiretos.

Geralmente em estudos de triagem, são usadas as linhagens TA100 (detecta mutágenos que causam substituição de pares de bases) e a TA98 (detecta mutágenos que causam mudança na matriz de leitura – *frameshift*), pela eficiência na detecção de grande número de agentes mutagênicos. A substituição da linhagem de *S. typhimurium* TA98 pela YG1024, neste estudo, baseou-se em dados da literatura que demonstraram a sensibilidade na detecção de atividade mutagênica na urina em vários trabalhos (GABBANI *et al.*, 1999; SMITH *et al.*, 2000; VERMEULEN *et al.*, 2003). Devido ao fato da N-hidroxiarilamina ser uma enzima envolvida na ativação metabólica de amins aromáticas e nitroarenos mutagênicos, o gene da O-acetiltransferase (OAT) da *Salmonella typhimurium* TA1538 foi clonado no plasmídeo pBR322 e introduzido na TA98, resultando numa nova linhagem, a YG1024, que abriga múltiplas cópias do plasmídeo pYG219 e apresenta cerca de cem vezes mais atividade da OAT do que a linhagem controle, mostrando-se extremamente sensível em detectar a atividade mutagênica das arilhidroxilaminas, nitroarenos e amins aromáticas (WATANABE *et al.*, 1990).

Bosso (2000), avaliando a atividade mutagênica da urina de cortadores de cana, observou diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ) na atividade mutagênica das amostras

de urina dos trabalhadores expostos quando comparada ao grupo controle na linhagem YG1024, apenas na presença de metabolização.

Em um estudo realizado com trabalhadores expostos a HPAs, Simioli *et al.* (2004), demonstram atividade mutagênica urinária na linhagem YG1024 (+S9), duas vezes maior no grupo exposto em relação a atividade mutagênica das urinas do grupo controle.

Pavanello *et al.* (2002a), avaliaram a atividade mutagênica na urina após o consumo de hamburger e, observaram que todas as amostras avaliadas foram mutagênicas na linhagem YG1024 com ativação metabólica. Na urina de pacientes em tratamento dermatológico com pomada a base de alcatrão, Gabbani *et al.* (1999) obtiveram atividade mutagênica em 93% das amostras avaliadas com a linhagem YG1024 com metabolização. As linhagens TA98 e YG1024 na presença de metabolização, foram utilizadas por Bowman *et al.* (2002), em um estudo que demonstrou a correlação da concentração da nicotina e do carvão com a mutagenicidade urinária de fumantes. Na análise da atividade mutagênica em indivíduos não fumantes expostos a fumaça de cigarro, a linhagem YG1024 foi mais eficiente que a TA98 (SMITH *et al.*, 2000).

Nossos resultados estão condizentes com os dados da literatura, pois, foi observado aumento estatisticamente significativo ( $p \leq 0,05$ ) avaliando diversos parâmetros (Tabela 10), na atividade mutagênica das amostras de urina coletadas de indivíduos expostos aos solventes orgânicos, apenas na linhagem YG1024 (+S9).

A resposta da linhagem YG1024 (+S9) às amostras do grupo exposto, demonstram a presença de mutágenos indiretos, pertencentes aos grupos dos HPAs, nitroarenos e aminas aromáticas. Essas classes de compostos são conhecidas por sua atividade mutagênica e /ou carcinogênica em mamíferos, pois as lesões resultantes das ligações desses compostos com o



DNA quando não reparadas poderão iniciar um processo neoplásico. Por isso, é muito comum o aparecimento de câncer de pulmão, do trato urinário e de pele em trabalhadores de coque e em limpadores de chaminé (LEE *et al.*, 2002; TEIXEIRA *et al.*, 2002).

As propriedades físico-químicas dos solventes, podem resultar em distúrbios nas estruturas celulares, tais como o DNA (PHILIPS & JENKINSON, 2001). O benzeno é um hidrocarboneto aromático, entre seus metabólitos, estão o fenol, a hidroquinona e a benzoquinona, que podem se ligar covalentemente ao DNA, sendo considerado mutagênico e carcinogênico (JOO *et al.*, 2004; NAKAYAMA *et al.*, 2004). O ácido hipúrico e o ácido metil-hipúrico são metabólitos urinários do tolueno e do xileno, respectivamente, usados como biomarcadores de exposição a esses solventes em estudos de monitoramento de indivíduos ocupacionalmente expostos (MANINI *et al.*, 2004). A exposição crônica ao n-hexano, um hidrocarboneto alifático, causa neuropatias, e sua neurotoxicidade é devida ao metabólito 2,5-hexanodione, que é usado como biomarcador urinário (HEUSER *et al.*, 2005).

Existem muitas evidências que as condições de cozimento dos alimentos e os hábitos alimentares influenciam na atividade mutagênica (MALAVEILLE *et al.*, 2004). Para um melhor entendimento dos resultados, foi aplicado um questionário que avaliou o estilo de vida, uso de medicamentos, hábitos alimentares, etc. (Tabela 3). No entanto, não foi observada nenhuma diferença que justificasse a atividade mutagênica detectada pela linhagem TA100, das 2 amostras de urina do grupo controle. Quando foram comparadas as média dos maiores valores de RM obtidos nos grupos, exposto e controle, verificou-se que, para a TA100 tais valores ficaram em torno de 1,2. Por outro lado, para a YG1024 (+S9) foi observado um aumento significativo ( $p = 0,008$ ) na média dos valores de RM no grupo exposto, comparados ao grupo controle (Tabela 7). Além disso, quando foram comparados os índices de aumento relativo (Tabela 8), observou-se

aumento significativo ( $p = 0,002$ ) no grupo exposto em relação ao grupo controle, apenas na linhagem YG1024 com metabolização.

Não apresentaram nenhuma atividade mutagênica (sem efeito dose-resposta e  $RM < 2,0$ ), 6 amostras de urina, sendo 3 amostras de cada grupo. Isso corresponde a 10% do total de amostras analisadas, evidenciando a influência de outros fatores ambientais, que não ocupacionais, na atividade mutagênica urinária.

De acordo com esses resultados, verificou-se que a linhagem YG1024 (+S9), parece ter sido a linhagem responsável pela detecção da mutagenicidade devida a exposição ocupacional, enquanto que, nas demais situações a atividade mutagênica pode estar relacionada a outros fatores ambientais.

## **6.2. Análise dos polimorfismos das enzimas de metabolização de xenobióticos e, sua influência nos danos ao material genético.**

A susceptibilidade à ação de compostos químicos pode derivar de características genéticas ou adquiridas do indivíduo, e pode estar associada com diferenças no metabolismo. A maioria dos carcinógenos genotóxicos que comprovadamente causam tumores é considerada pré-carcinógeno, ou seja, são compostos estáveis no pH fisiológico e, portanto, incapazes de reagir com o DNA. No entanto, os xenobióticos são biotransformados no organismo, podendo gerar produtos extremamente eletrofílicos que irão reagir com os centros nucleofílicos das células, dentre eles, regiões do DNA, levando a formação de aductos, mutações e, subsequente o risco do desenvolvimento de câncer. As diferenças na susceptibilidade aos efeitos dos carcinógenos ambientais podem surgir como resultante do polimorfismo de enzimas *CYP* e *GSTs*. De um modo geral, mas não absoluto, a formação de agentes eletrofílicos a partir de carcinógenos ambientais é catalisada pelas enzimas *CYP* e neutralizada pelas *GSTs*. (RIBEIRO *et al.*, 2003)

A biotransformação de xenobióticos envolve várias enzimas com especificidade de reação, sendo agrupadas em enzimas de fase I e II.

Dentre as enzimas de fase I, destacam-se as pertencentes à família *CYP*, que catalizam a inserção de um átomo de oxigênio ao substrato. A reação de oxidação pode resultar na ativação do composto, convertendo carcinógenos indiretos em eletrófilos ativos capazes de interagir com o DNA, RNA e proteínas. (PAVANELO & CONFLERO, 2000). Os polimorfismos genéticos para o gene *CYP2E1*, têm sido usados como marcadores genéticos de risco de câncer (KATO *et al.*, 1992; BOUCHARDY *et al.*, 2000).

As reações da fase II, catalizadas pelas *GSTs*, envolvem a conjugação com os grupos eletrofílicos de uma grande variedade de substratos endógenos e exógenos, promovendo a detoxificação e, tornando-os hidrossolúveis, sendo facilmente excretados (HAYES & PULFORD, 1995). Os genes *GSTM1* e *GSTT1* são polimórficos, podendo ter uma deficiência na atividade enzimática causada por uma deleção em homozigose do gene (ANWAR *et al.*, 1996; ABDEL-RAHMAN *et al.*, 1996).

Os solventes representam um importante grupo de poluentes em diferentes ambientes ocupacionais, destacando-se a indústria de borracha, de tintas, de plásticos e em laboratórios, é freqüente o uso de vários solventes.

A enzima *CYP2E1* catalisa a bioativação de diferentes procarcinógenos e protoxinas (anilina, cloretos alogenados e benzeno), dentre os vários substratos, estão, os solventes orgânicos etanol, acetona e o benzeno (KERREMANS, 1996).

A biotransformação do etanol pela *CYP2E1* produz acetaldeído e radicais livres (TERELIUS *et al.*, 1978). A exposição das células do fígado a esses metabólitos compromete a função celular, causando doenças como a cirrose hepática (LINDROS, 1995). As *GSTs* catalizam

a conjugação do acetaldeído e dos radicais livres, protegendo as células hepáticas dos metabólitos do etanol (FERNADEZ-CHECA *et al.*, 1993).

O benzeno é metabolizado em fenol, pelas células hepáticas, subsequentemente em hidroquinona na medula óssea e, convertido não-enzimaticamente em p-benzoquinona. Esses metabólitos são considerados tóxicos e geram espécies reativas de oxigênio, tais como  $O_2^-$  e  $H_2O_2$  (NAKAYAMA *et al.*, 2004). A hidroquinona induz a formação de micronúcleos, aumento na troca entre cromátides irmãs e aberrações cromossômicas (SILVA *et al.*, 2004).

Entre os hidrocarbonetos halogenados, encontra-se o diclorometano (DCM), solvente orgânico muito utilizado pelas indústrias e, a exposição crônica deste substrato para a *CYP2E1*, causa danos cerebrais e hepáticos (FECHNER *et al.*, 2001).

Com base nesses dados, decidiu-se avaliar os polimorfismo dos genes *CYP2E1*, *GSTT1* e *GSTM1* em indivíduos ocupacionalmente expostos a solventes orgânicos. O desequilíbrio entre os sistemas enzimáticos, ativadores e os detoxificadores, pode levar ao acúmulo de substâncias genotóxicas no organismo, causando efeitos adversos à saúde.

A partir do sangue coletado de cada indivíduo analisado, foi utilizada a técnica de PCR para a amplificação dos genes *CYP2E1*, *GSTM1* e *GSTT1*.

No presente estudo, 100% dos indivíduos do grupo controle apresentaram genótipo homozigoto selvagem (c1/c1) para o gene *CYP2E1 -PstI*, no grupo exposto observou-se uma frequência de 96,6% e 3,4% do genótipo homozigoto selvagem (c1/c1) e do genótipo heterozigoto (c1/c2), respectivamente. Esse tipo de polimorfismo do *CYP2E1 -PstI*, é comum em Orientais, raro em caucasianos e vários outros grupos étnicos (LUCAS *et al.*, 2001). As frequências dos polimorfismos do gene *CYP2E1 -PstI* demonstradas nesta pesquisa, estão de acordo com outros estudos (GATTAS & SOARES-VIEIRA, 2000; CANALLE *et al.*, 2004).

Devido à baixa frequência do alelo *c2* na população estuda, assim como é baixa sua frequência na população caucasiana em geral (KIM & NOVAK, 1990), o estabelecimento de uma associação estatística entre o polimorfismo *CYP2E1-PstI* e atividade mutagênica urinária não foi possível nesse estudo e, requer um número muito maior de voluntários. Qu *et al.* (2005), chegaram a essa mesma conclusão, avaliando exposição ocupacional ao benzeno, através da dosagem de metabólitos urinários e o polimorfismo do gene *CYP2E1*.

Nossos resultados demonstram uma frequência de 91,5% de ausência apenas do gene *GSTM1*, 81,1% de ausência apenas do gene *GSTT1* e 74,6% de ausência de ambos os genes (*GSTM1* e *GSTT1*). D'Arce e Cólus (2000) e Losi-Guembarovski (2002), estudando indivíduos brasileiros saudáveis de diferentes origens étnicas, provenientes do Paraná encontraram, respectivamente, as frequências de 33% e 48,86% de ausência do gene *GSTM1*. Arruda *et al.* (1999) contram uma frequência de 36,9% de *GSTM1* nulo em indivíduos das regiões norte, nordeste e sudeste do Brasil. Em caucasianos da região sudeste do Brasil, Gattás e Soares-Vieira (2000), obeservaram uma frequência de 60,2% do genótipo *GSTM1* nulo. Um estudo feito com uma população da Turquia, a frequência do genótipo *GSTM1* nulo foi de 51,9%, do *GSTT1* nulo foi de 17,3% e de ambos os genes 9% (ADA *et al.*, 2004). Zhang *et al.* (2004) encontraram uma frequência de 38% e 53% dos genótipos nulos, *GSTT1* e *GSTM1*, respectivamente, em trabalhadores chineses.

Não existem razões óbvias para explicar a discrepância entre os resultados obtidos em diferentes estudos. Um problema potencial quando se avalia as frequências dos polimorfismos genéticos é a grande mistura de etnias existentes no Brasil. A origem étnica da população brasileira é composta de imigrantes europeus, africanos, asiáticos e índios; além disso, são poucos os estudos envolvendo os polimorfismos e sua distribuição entre as etnias.

Nesse estudo, foram observadas diferenças entre o grupo controle e exposto, porém sem significância estatística, na média dos índices de aumento relativo no número de revertentes his+, em indivíduos com o genótipo *GSTM1/GSTT1* nulo. A Figura 8, demonstra um aumento desse valor nas amostras de urina de indivíduos com genótipo *GSTM1/GSTT1* nulo do grupo exposto, comparado com o grupo controle, para a linhagem YG1024 (+S9). Apesar dessa diferença não ter significância estatística, provavelmente devida a variações interindividuais na resposta mutagênica, observou-se que para o grupo exposto a média dos índices de aumento relativo no número de revertentes his+ (0,78) foi bem maior que a encontrada no grupo controle (0,33). Esses resultados estão de acordo com os dados de literatura, que mostram a relação dos genótipos *GSTM1* e *GSTT1* nulos, com os danos no material genético (PAVENELLO *et al.*, 2002b; LEE *et al.*, 2003; TUIMALA *et al.*, 2004).

Resultados semelhantes foram encontrados por Pavanello *et al.* (2002b), nas amostras de urina de fumantes, onde indivíduos com genótipo *GSTM1* nulo apresentaram um discreto aumento, sem diferença estatisticamente significativa, na mutagenicidade urinária (YG1024 com ativação metabólica), comparado com indivíduos com *GSTM1* presente. A concentração de 1-hidroxi-pireno na urina de indivíduos expostos ocupacionalmente a HPAs, demonstrada por Lee *et al.* (2003), foi um pouco maior, porém não significativa, em trabalhadores com genótipo *GSTM1/GSTT1* nulo, do que a encontrada em trabalhadores com os respectivos genótipo positivos.

Tuimala *et al.* (2004), também demonstraram um discreto aumento, sem significância estatística, na frequência de troca entre cromátides irmãs em indivíduos com genótipo *GSTT1* nulo em relação aos indivíduos com genótipo *GSTT1* presente (8,64 versus 7,93).

Teixeira *et al.* (2004) demonstraram que as deleções dos genes *GSTT1* e *GSTM1* e os polimorfismos do gene *CYP2E1* aumentaram as trocas entre cromátides irmãs em trabalhadores expostos a baixas concentrações de estireno.

Um estudo feito com trabalhadores de minas de carvão demonstrou uma diferença estatisticamente maior nos aductos de DNA nos indivíduos com genótipo *GSTM1* nulo (PAVANELLO *et al.*, 2004).

Leopardi *et al.* (2003), observaram uma frequência de micronúcleo menor em policiais de trânsito com o genótipo *GSTM1* nulo.

Existem muitas divergências entre os estudos que correlacionam os polimorfismos enzimáticos e os danos ao material genético. Pitarque *et al.* (2002) não encontraram nenhum efeito do polimorfismo do gene *GSTM1* e as trocas entre cromátides irmãs em trabalhadores expostos a solventes. Os polimorfismos dos genes *GSTT1* e *GSTM1* encontrados em trabalhadores coreanos expostos a HPAs, não apresentaram nenhum efeito na formação de aductos de DNA e na concentração de 1-hidroxipireno urinário (LEE *et al.*, 2003).

Silva *et al.* (2004) também não demonstraram o efeito significativo do genótipo *GSTT1* nulo nas frequências de micronúcleos e trocas entre cromátides irmãs em linfócitos humanos tratados com hidroquinona (um metabólito do benzeno). Por outro lado, no mesmo trabalho, observou-se que os indivíduos com genótipo *GSTM1* nulo apresentaram um aumento significativo ( $p < 0,013$ ) na frequência da troca entre cromátides irmãs, comparados aos indivíduos com genótipo selvagem.

Qu *et al.* (2005) não demonstraram diferença estatisticamente significativa nas concentrações de metabólitos urinários de benzeno entre indivíduos com genótipo *GSTT1* presente e nulo, expostos ocupacionalmente ao benzeno.

Os hábitos alimentares, medicamentos e tabagismo têm grande influência na atividade mutagênica urinária. Peters *et al.* (2004) observaram atividade mutagênica significativa na urina de indivíduos após consumo de carne vermelha frita, no entanto, a mutagenicidade urinária não foi influenciada pelos genótipos *GSTM1*, *NAT1* e *NAT2*. Pavanello *et al.* (2002a), demonstraram que a atividade do *CYP1A2* aumenta as concentrações de mutágenos na urina, especialmente em acetiladores lentos de *NAT2*, quando comparados aos acetiladores rápidos. Altas concentrações de mutágenos urinários foram observadas em pacientes após tratamento dermatológico com uma pomada a base de alcatrão. Os valores da mutagenicidade urinária dos indivíduos com genótipo *GSTM1* nulo foram maiores dos que os observados nos indivíduos com genótipo selvagem (GABBANI *et al.*, 1999).

Deleções dos genes *GSTT1* e *GSTM1* são comuns na maioria da população. O aumento do risco de câncer associado a ausência dos genes *GSTT1* e *GSTM1* não é claro. Aktas *et al.* (2001), encontraram uma frequência de 64,5% do genótipo *GSTM1* nulo em pacientes com câncer de bexiga invasivo, tais resultados foram estatisticamente significativos quando comparado ao grupo controle, demonstrando que o polimorfismo do gene *GSTM1* pode ser um importante fator de risco para o câncer de bexiga. Elevado risco de câncer de bexiga foi associado a ausências dos genes *GSTT1* e *GSTM1* em fumantes num estudo de caso-controle realizado na Argentina. Outro dado interessante revelado nesse estudo foi que o cigarro teve mais influência do que o genótipo (MOORE *et al.*, 2004). Outros estudos epidemiológicos demonstraram um aumento discreto no risco de câncer de bexiga e pulmão em indivíduos com *GSTM1* nulo (McWILLIAMS *et al.*, 1995; D'ERRICO *et al.*, 1996).

Hirnoven *et al.* (1996) não observaram a influência do genótipo nulo para os genes *GSTT1* e *GSTM1* no risco de doenças pulmonares em trabalhadores expostos a asbestos.



Resultados semelhantes foram demonstrados por Yang *et al.* (2004) em um estudo avaliando chinesas com câncer de pulmão.

A maioria dos estudos envolvendo esses genes, utiliza protocolos que não detectam genótipos heterozigotos. No entanto, no estudo de caso-controle com câncer de mama, Parl (2004) empregou uma técnica capaz de detectar o genótipo heterozigoto. Seus resultados demonstram um aumento significativamente maior de risco de câncer de mama para o genótipo +/+ do que para o -/- do gene *GSTM1*.

Nossos resultados não permitiram uma associação significativa entre o genótipo e a mutagenicidade urinária, porém, observou-se um predomínio de respostas mutagênicas positivas das amostras de urina do grupo exposto com genótipo *GSTM1/GSTT1* nulo. Das 7 amostras de urina que foram positivas no teste de Ames, 6 eram de indivíduos com genótipo *GSTM1/GSTT1* nulo para a linhagem YG1024 (+S9). Com isso, fica clara a relevância dos estudos que avaliam o risco da exposição ocupacional a solventes orgânicos, através do uso de biomarcadores biológicos e dos perfis genéticos e, assim, promover medidas que resguardecam a saúde desses trabalhadores.

## 7. Conclusões

No presente trabalho foi proposto avaliar a atividade mutagênica de indivíduos expostos ocupacionalmente a solventes orgânicos e seus respectivos controles (indivíduos sem a exposição); determinar os polimorfismos dos genes *GSTM1*, *GSTT1* e *CYP2E1* nesses indivíduos; e averiguar a existência ou não da associação dos genótipos e atividade mutagênica nas amostras de urina. Os resultados apresentados permitem as seguintes conclusões:

1. A linhagem YG1024, é um indicador adequado para ensaios de mutagenicidade urinária em indivíduos expostos ocupacionalmente a solventes orgânicos. E, apenas para a linhagem YG1024 na presença de ativação metabólica houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos.

2. Dentre os participantes desse estudo, observou-se a seguinte distribuição dos genótipos: 90% e 69% dos indivíduos do grupo controle e exposto (respectivamente) apresentaram genótipo *GSTM1/GSTT1* nulo; o genótipo *GSTM1* presente foi encontrado apenas no grupo exposto (17%); e o genótipo *GSTT1* presente foi encontrado em 10% e 14% dos indivíduos do grupo controle e exposto, respectivamente.

3. Observou-se um predomínio de respostas mutagênicas positivas das amostras de urina do grupo exposto com genótipo *GSTM1/GSTT1* nulo. A baixa frequência do alelo *c2* (*CYP2E1-PstI*), a inexistência da combinação dos genótipos *GSTM1* e *GSTT1* selvagens, acrescido ao tamanho da população estudada, são fatores que podem ter impedido a demonstração da associação entre os outros genótipos e a atividade mutagênica urinária.

4. A atividade mutagênica teve um aumento estatisticamente significativo no grupo exposto, assim sendo, a exposição a solventes orgânicos pode ser considerado um fator de risco para a saúde de tais indivíduos. No entanto, são necessários mais estudos para tentar elucidar os mecanismos genéticos (biotransformação de xenobióticos) para a criação de medidas preventivas primárias.

## 8. Referências bibliográficas:

ABDEL-RAHMAN, S. Z.; EL-ZEN, R. A.; ANWAR, W. A .; AU, W.W. A multiplex PCR procedure for polymorphic analysis of *GSTM1* and *GSTT1* genes in population studies. **Cancer Lett.**, v. 107, p. 229-233, 1996.

ADA, A. O.; SÜZEN, S. H.; ISCAN, M. Polymorphisms of cytochrome P450 1A1, glutathione S-transferases M1 and T1 in Turkish population. **Toxicol. Lett.**, v. 151, p. 311-325, 2004.

AKTAS, D.; OZEN, H.; ATSU, H.; SOZEN, S.; TUNCBILEK, E. Glutathione S-transferase M1 gene polymorphism in bladder cancer patients: a marker for invasive bladder cancer? **Mutat. Res.**, v.125, p. 1-4, 2001.

ALEYNIK, M. K.; LIEBER, C. S. Dilinoleoylphosphatidylcholine decrease ethanol-induced cytochrome P4502E1. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.288, n. 4, p. 1047-1051, 2001.

ALI, N.; TARDIF, R. Toxicocinetik modeling of the combined exposure to toluene and n-hexane in rats and humans. **J. Occup. Health**, v. 41, p. 95-103, 1999.

ANDRE, V.; LEBAILLY , P.; DESLANDS, E.; HENRY-AMAR, M.; GAUDUCHON, P. Biomonitoring of urine mutagenicity with the Ames test: improvement of the extraction/concentration method. **Mutat. Res.** , v. 520, p. 199-205, 2002.

ANWAR, W. A.; ABDEL-RAHMAN, S. Z.; EL-ZEIN, R. A.; MOSTAFA, H. M.; AU, W.W. Genetic polymorphism of *GSTM1*, *CYP2E1* and *CYP2D6* in Egyptian bladder cancer patients. **Carcinogenesis**, v. 17, p. 1923- 1929, 1996.

ARRUDA, C. V. R.; GRINOLLI, M. E.; GONÇALVES, M. S.; SOARES, M. C.; MENEZES, R.; SAAD, S. T. O.; COSTA, F. F. Prevalence of homozygosity for the deleted alleles of glutathione S-transferase mu (*GSTM1*) and theta (*GSTT1*) among distinct ethnic groups from Brazil: relevance to environmental carcinogenesis? **Clin. Genetics**, v. 54, p. 210-214, 1998.

AUTRUP, H. Genetic polymorphisms in human xenobiotic metabolizing enzymes as susceptibility factors in toxic response. **Mutat. Res.**, v.464, p.65-76, 2000.

AU, W.W.; SIERRA-TORRES, S. H.; TYRING, S. R. Acquired and genetics susceptibility to cervical cancer. **Mutat. Res.**, v.544, p. 361-364, 2003.

BARTSCH, H.; NAIR, U.; RISCH, A.; ROJAS, M.; WIKMAN, H.; ALEXANDROV, K. Genetic polymorphism of *CYP* genes, alone or in combination, a risk modifier of tobacco-related cancers. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, v.9, p. 3-28, 2000.

BERGAMASCHI, E.; BRUSTOLIN, A.; DePALMA, G. Biomarkers of dose and susceptibility in cyclists exposed to monoaromatic hydrocarbons. **Toxicol. Lett.**, v.108, p. 241-247, 1999.

BOSSO, R. M. V. **Avaliação da atividade mutagênica da fuligem sedimentável proveniente da queima da cana-de-açúcar e da urina dos cortadores de cana através de ensaios com**

**mutação gênica reversa em *Salmonella typhimurium*.** 2000.146f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). IBILCE, UNESP- São José do Rio Preto.

BOUCHARDY, C.; HIRNOVEN, A.; COUTELLE, C.; WARD, P. J.; DAYER, P.; BENHAMOU, S. Role of alcoholdehydrogenase 3 and cytochrome p450E1 genotypes in susceptibility to cancer of the upper aerodigestive tract. **Int. J. Cancer**, v.87, p.734-740, 2000.

BOWMAN, D. L.; SMITH, C. J.; BOMBICK, B. R.; AVALOS, J. T.; DAVIS, R. A.; MORGAN W. T.; DOLITTLE, D. J. Relationship between FTC tar and urine mutagenicity in smokers of tobacco-burning or Eclipse cigarettes. **Mutat. Res.**, v.521, p.137-149, 2002.

BROCKSTEDT, U.; KRAJINOVIC, M.; RICHER, C.; MATHONNET, G.; SINNET, D.; PFAU, W.; LABUDA, D. Analysis of bulky DNA adduct levels in human breast tissue and genetic polymorphisms of cytochromes P450 (*CYPs*), myeloperoxidase (*MPO*), quinone oxidoreductase (*NQO1*), and glutathione S-transferase (*GSTs*). **Mutat. Res.**, v. 516, p. 41-47, 2002.

BUSCH, S. C.; NOTANI, P. N.; BHISEY, R. A. Polymorphisms at *GSTM1*, *GSTM3* and *GSTT1* gene loci and susceptibility to oral cancer in an Indian population. **Carcinogenesis**, v. 23, p. 803-807, 2002.

BURIM, R.V.; CANALLE, R; MARTINELLI, A. L. C.; TAKAHASHI, C. S. Polymorphisms in glutathione S-transferases *GSTM1*, *GSTT1* and *GSTP1* and cytochromes P450 *CYP2E1* and *CYP2A1* and susceptibility to cirrhosis or pancreatitis in alcoholics. **Mutagenesis**, v.19, n. 4, p. 291-298, 2004.

BUTKIEWICZ, D.; GRZYBOWSKA, E.; PHILIPS, D. H.; HEMMINKI, K.; CHORAZY, M. Polymorphisms of the *GSTP1* and *GSTM1* genes and PAH-DNA adducts in human mononuclear white blood cells. **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 35, p. 99-105, 2000.

CANALLE, R.; BURIM, R.; TONE, L. G.; TAKAHASHI, C. S. Genetic polymorphisms and susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia. **Environ. Mol. Mutagen.**, v.43, p. 100-109, 2004.

CERNÁ, M.; PASTORKOVÁ, A.; MYERS, R. S.; RÖSSNER, P.; BINKOVÁ, B. The use of a urine mutagenicity assay in the monitoring of environmental exposure to genotoxins. **Mutat. Res.**, v.391, p. 99-101, 1997.

CHOI, B. C. K.; CONNOLLY, J. G.; ZHOU, R. H. Application of urinary mutagen testing to detect workplace hazardous exposure and bladder cancer. **Mutat. Res.**, v. 341, p. 207-216, 1995.

D'ARCE, L. P. G.; CÓLUS, I. M. S. Cytogenetic and molecular monitoring of brazilian farmers exposed to pesticides. **Teratog. Carcinogen. Mutagen.**, v. 20, p. 161-170, 2000.

D'ERRICO, A.; TAIOLI, E.; CHEN, X.; VINEIS, P. Genetic metabolic polymorphisms and the risk of cancer: a review of the literature. **Biomarkers**, v. 1, p. 149-173, 1996.

EINISTÖ, P.; NOEHMI, T.; ISHIDATE, M. Sentivity of *Salmonella typhimurium* YG1024 urine mutagenicity caused by cigarette smoking. **Mutat. Res.**, v. 245, p. 87-92, 1990.

FATIMA, S.; PRABHAVATHI, P. A.; PADMAVATHI, P.; REDDY, P. P. Analysis of chromosomal aberrations in men occupationally exposed to cement dust. **Mutat. Res.**, v.490, p.176-186, 2000.

FECHNER, G.; ORTMANN, A.; KÖHLER, H. Fatal intoxication due to excessive dichloromethane inhalation. **Forensic Sci. Int.**, v.122, p. 69-72, 2001.

FERNADEZ-CHECA, J. C. ; HIRANO, T.; TSUKAMOTO, H.; KAPLOWITZ, N. Mitochondrial glutathione depletion in alcoholic liver disease. **Alcohol**, v. 10, p. 469-475, 1993.

FREEMAN, J. E.; STIRLING, D.; RUSSEL, A. L.; WOLF, C. R. cDNA sequence, deduced amino acid sequence, predicted gene structure and chemical regulation of mouse *CYP2E1*. **Biochem. J.**, v. 281, p. 689-695, 1992.

GABBANI, G.; PAVANELLO, S.; NARDINI, B.; TOGNATO, O.; BORDIN, A.; FORNASEA, C. V.; BEZZE, G.; CLONFERO, E. Influence of metabolic genotype *GSTM1* on levels of urinary mutagens in patients treated topically with coal tar. **Mutat. Res.**, v.440, p. 27-33, 1999.

GAO,Y.; ZHANG, Q. Polymorphisms of the *GSTM1* and *CYP2D6* genes associated with susceptibility to lung cancer in Chinese. **Mutat. Res.**, v.444, p. 441-449, 1999.

GASPAR, P.; MOREIRA, J.; KVITKO, K.; TORRES, M.; MOREIRA, A.; WEINER, T. *CYP1A1*, *CYP2E1*, *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1* and *TP53* polymorphisms: do they indicate



susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease and non-small-cell lung cancer? **Genet. Mol. Biol.**, v. 27, n. 2, p. 133-138, 2004.

GATTAS, G. J.; SOARES-VIEIRA, J. A. Cytochrome P450 –2E1 and glutathione S-transferase mu polymorphisms among Caucasians and mulattoes from Brazil. **Occup. Med.**, v.50, p. 508-511, 2000.

GUDMUNDSDOTTIR, K.; TRYGGVADOTTIR, L.; EYFJORD, J. E. *GSTM1*, *GSTT1*, nad *GSTP1* genotypes in relation to breast cancer risk and frequency of mutations in the p53 gene. **Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.**, v.10, p. 1169-1173, 2001.

HANSEN, A. M.; WALLIN, H.; BINDERUO, M. L.; DYBDAHL, M.; AUTRUP, H.; LOFT, S.; KNUDSEN, L. E. Urinary 1-hydroxypyrene and mutagenicity in bus drivers and mail carriers exposed to urban air pollution in Denmark. **Mutat. Res.**, v.557, p. 7-17, 2004.

HAYES, J. D.; PULFORD, D. J. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST\* and the contribution of the isoenzymes to cancer and drug resistance. **Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.**, v. 30, p.445-600, 1995.

HEUSER, V. D.; ANDRADE, V. M.; SILVA, J.; ERDTMAN, B. Comparison of genetic damage in brazilian footwear-workers exposed to solvent-based or water-based adhesive. **Mutat. Res.**, v. 583, p. 85-94, 2005.

HIRNOVEN, A.; SAARIKOSKI, S. T.; LINNAINMAA, K.; KOSKINEN, K. Glutathione S-transferase and N-acetyltransferase genotypes and asbestos associated pulmonary disorders. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 88 (24), p. 1853-1856, 1996.

HOUK, V. S. The genotoxicity of industrial waste and effluents. **Mutat. Res.**, v.27, p.91-138, 1992.

INGELMAN-SUNDBERG, M. Genetic susceptibility to adverse effects of drugs and environmental toxicants. The role of the *CYP* family of enzymes. **Mutat. Res.**, v.482, p.11-19, 2001.

JOHNS, L. E.; HOULSTON, R. S. Glutathione S-transferase  $\mu 1$  (*GSTM1*) status and bladder cancer risk: a meta analyses. **Mutagenesis**, v.15, p. 399-404, 2000.

JOO, W. A.; SUL, D.; LEE, D. Y.; KIM, C. W. Proteomic analyses of plasma proteins of workers exposed to benzene. **Mutat. Res.**, v.558, p. 35-44, 2004.

JUNEJA, T. R.; TALUKDAR, A.; GUPTA, R. L. Mutagenicity of sulfoscanate: a comparative study. **Mutat. Res.**, v. 518, p.155-161, 2002.

JUNXIANG, W.; SHI, J.; LIJIAN, H.; WU, D.; JIN, X.; ZHAO, N.; HUANG, W.; HU, G. Association of genetic polymorphisms in *CYP2E1*, *MPO*, *NQO1*, *GSTT1* and *GSTM1* genes with benzene poisoning. **Environ. Health Perspect.**, v. 110, n. 12, p.110-112, 2002.

KATO, S.; SHIELDS, P. G.; CAPORASO, N. E.; HOOVER, R. N.; TRUMP, B. F.; SUGRMURA, H.; WESTON, A.; HARRIS, C. C. Cytochrome P450IIE1 genetic polymorfisms, racial variation, and lung cancer risk. **Cancer Res.**, v.52, p. 6712-6715, 1992.

KATSU, H.; HINODA, S. S.; AKAJRMA, T. .M. CYP2E1 level in rat injured by interaction between carbon tetrachloride and chloroform. **J. Occup. Health**, v.40, p.223-229,1998.

KERREMANS, A. L. M. Cytochrome P450 isoenzymes – RMportance for the internist. **Netherlands J. Med**, v. 48, p. 237-243, 1996.

KIM, S. G.; NOVAK, F. Role of P450 IIE1 in the metabolism 3-hydroxypyridine, a constituent of tobacco smoke redox cycling and DNA strand scission by the metabolite 2,5-dihydroxypyridine. **Cancer Res.**, v. 50, p. 5333-5339, 1990.

KLAASSEN, C. D. **Cassarett and Doull's – Toxicology: the basic science of poisons**. New York: McGraw-Hill. 2001. 1236 p.

LANG, M.; PELKONEN, O. Metabolism of xenobiotics and chemical carcinogenesis. In: VINEIS, P. ; MALATS, N.; LANG, M.; D'ERRICO, A.; CUZICK, J.; BOFFETTA, P. (Eds), **Metabolic Polymorphisms and susceptibility to cancer**, IARC Sci. Publi., n.148, IARC, Lyon, France, 1999. chap. 3, p.13-22.

LEE, J.; KANG, D.; LEE, K. J.; ICHIBA, M.; ZHANG, J.; TOMOKUNI, K.; HWANG E.; PARK, C.; HA, M.; KIM, S.; HAN, S.; CHOI, J.; LEE, E.; JANG, J.; STRICKLAND, P. T.;

HIRNOVEN, A.; CHO, S. Influence of GSTM1 genotype on association between aromatic DNA adducts and urinary PAH metabolites in incineration workers. **Mutat. Res.**, v.514, p. 213-222, 2002.

LEE, K. H.; ICHIBA, M.; ZHANG, J.; TOMOKUNI, K.; HONG, Y. C.; HA, M.; KNOW, H. J.; KOH, S. B.; CHOI, H. R. Multiple biomarkers study in painters in a shipyard in Korea. **Mutat. Res.**, v.540, p. 89-98, 2003.

LEHNEBACH, A.; KUHN, C.; PANKOW, D. Original investigation: dichloromethane as an inhibitor of cytochrome oxidase in different tissues of rats. **Arch. Toxicol.**, v.69, n. 3, p. 180-184, 1995.

LEOPARDI, P.; ZIJMO, A.; MARCON, F. ; CONTI, L.; CORERE, A.; VERDINA, A.; GALATI, R.; TOMEI, F.; BACCOLO, T. P.; CREBELLI, R. Analysis of micronuclei in peripheral blood lymphocytes of traffic wardens: effects of exposure, metabolic genotypes, and inhibition of excision repair in vitro by ARA-C. **Environ. Mol. Mutagen.**, v.41, p. 126-130, 2003.

LINDROS, K. O. Alcoholic liver disease: pathobiological aspects. **J. Hepatol.**, v.1, n. 23, p. 7-15, 1995.

LOKTIONOV, A. Common gene polymorphisms, cancer progression and prognosis. **Cancer Lett.**, v. 208, p. 1-33, 2004.

LOSI-GUEMBAROVSKI, R.; D'ARCE, L. P. J.; CÓLUS, I. M. S. Gluthathione S-transferase Mu (GSTM1) null genotype in relation to gender, age and smoking status in a health Brazilian population. **Genetics and Mol. Biol.**, v.25 , p. 357-360, 2002.

LUCAS, D.; FERRARA, R.; GANZALES, E.; ALBORES, A.; MANNO, M.; BERTHOU, F. Cytochrome CYP2E1 phenotyping and genotyping in the evaluation of health risks from exposure to polluted environments. **Toxicol. Lett.**, v.124, p. 71-81, 2001.

MALAVEILLE, C.; FIORINI, L.; DAVICO, N.; BERTINETTI, S.; ALLEGRO, G.; HAUTEFEUILLE, A.; SACERDOTE, C.; VINEIS, P. Randomized controlled trial of dietary intervention: association between level of urinary phenolics and anti-mutagenicity. **Mutat. Res.**, v. 561, p. 83-90, 2004.

MANINI, P.; ANDREOLI, R.; NIESSEN, W. M. A.; Liquid chromatography-mass espectrometry in occupational toxicology: A novel approach to the study of biotransformation of industrial chemicals. **J. Chromatogr. A**, v. 1058, p. 21-37, 2004.

MARON, D. .M.; AMES, B. N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. **Mutat. Res.**, v.113, p.173-225, 1983.

MATTHIAS, C.; JAHNKE, V.; FRYER, A. A.; STRANGE, R. C. First results on the influence of polymorphisms at gluthathione s-transferase, cytochrome P-450 and tumor necrosis factor gene loci on the development of multiple head and neck cancer. **Laryngorhinootologie**, v. 82, p. 25-30, 2002.

McWILLIAMS, J. G.; SANDERSON, B. J. S.; HARRIS, E. L.; RICHER-BOE, K. E.; HENNER W. D. Gluthathione S transferase M1 (GSTM1) deficiency and lung cancer risk. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, v. 4, p. 589-594, 1995.

MIELZYNSKA, D.; BRASZCZYNSKA, Z.; SIWINSKA, E.; SMOLIK, E.; BUBAK, A.; SOKAL, J. A. Exposure of coken-over workers to polycyclic aromatic hydrocarbons based on biological monitoring results. **Am. Ind. Hyg. Assoc. J.**, v. 58, p. 661-666, 1997.

MITRUNEN, K.; JOURENKOVA, N.; KATAJA, V.; ESKELINEN, M.; KOSMA, V. M.; BENHAMOU, S.; VAINIO, H.; UISITUPA, M.; HIRNOVEN, A. Gluthathione S-transferase M1, M2, P1 and T1 genetic polymorphisms and susceptibility to breast cancer. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, v. 10, p. 229-236, 2001.

MOHAMADI, S.; UNIYME, N.; BAO-ZEN, Z. Effect of pH on mutagenicity of urine from smokers and non-smokers. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v.13, p. 21-27, 2003.

MOORE, L. E.; WIENCK, J. K.; BATES, M. N.; ZHENG, S.; REY, O. A.; SMITH, A. H. Investigation of genetic polymorphisms and smoking in a bladder cancer case-control study in Argentina. **Cancer Lett.**, v. 211, p. 199-207, 2004.

MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. **Mutat. Res.**, v. 455, 29-60, 2000.

MURRAY, M. Impaired CYP function and regulation in experMental liver disease. **Toxicology**, v. 178, p.8-9, 2002.

NAKAYAMA, A.; NOGUCHI, Y.; MORI, T.; MORISAWA, S.; YAGI, T. Comparison of mutagenic potentials and mutation spectra of benzene metabolites using *supF* shuttle vectors in human cells. **Mutagenesis**, v. 19, p. 91-97, 2004.

NORPPA, H. Genetic polymorphisms and chromosome damage. **Int. J. Hyg. Environ. Health**, v.204, p. 31-38, 2001.

PARL, F. Glutathione S-transferase genotypes and cancer risk. **Cancer Letters**, v. 221, n.2, p. 123-29, 2005.

PAVANELLO, S.; CONFLERO, E. Biological indicators of genotoxic risk and metabolic polymorphisms. **Mutat. Res.**, v. 463, p. 285-308, 2000.

PAVANELLO, S.; SIMIOLI, P.; LUPI, S.; GABBANI, G.; GREGORIO, P.; CLONFERO, E. Role of metabolic polymorphisms NAT2 and CYP1A2 on urinary mutagenicity after a pan-fried hamburger meal. **Food Chem. Toxicol.**, v. 40, p. 1139-1144, 2002a.

PAVANELLO, S.; SIMIOLI, P.; LUPI, S.; GABBANI, G.; GREGORIO, P.; CLONFERO, E. Exposure levels and cytochrome P450 1A2 activity, but not N-acetyltransferase, glutathione S transferase (GST) M1 and T1, influence urinary mutagen excretion in smokers. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, v.11, p.998-1103, 2002b.

PAVANELLO, S.; SIWINSKA, E.; MIELZYNSKA, D.; CLONFERO, E. GSTM1 null genotype as a risk factor for anti-BPDE-DNA adduct formation in mononuclear white blood cells of coke-oven works. **Mutat. Res.**, v.558, p. 53-62, 2004.

PESCH, B.; HAERTING, J.; RANFT, U.; KLIMPEL, A.; OELSCHLAGEL, B.; SCHILL, W. Occupational risk factor from urothelial carcinoma: agent-specific results from a case-control study in germany. **MURC Study Group Multicenter Urothelial and Cancer Inst. J. Epidemiol.**, v.29, p.238-247, 2000.

PETERS, U.; SINHA, R.; BELL, D. A.; ROTHMAN, N.; GRANT, D. J.; WATSON, M. A.; KULLDORFF, M.; BROOKS, L.; WARREN, S. H.; DeMARINE, D. M. Urinary mutagenicity and fried red meat intake: Influence of cooking temperature, phenotype, and genotype of metabolizing enzymes in a controlled feeding study. **Environ. Mol. Mutagen.**, v.43, p. 53-74, 2004.

PHILIPS, B.J.; JENKINSON, P. Is ethanol genotoxic? A review of the published data. **Mutagenesis**, v.16, p. 91-101, 2001.

PITARQUE, M.; VAGLENOV, A.; NOSKO, M; PAVLOVA, S.; PETKOVA, V.; CREUS, A; NORPPA, H. MARCOS, R. Sister chromatid exchanges and micronuclei in peripheral lymphocytes of shoe factory workers exposed to solvents. **Environ. Health Perspect.**, v. 110, p. 399-404, 2002.



QU, Q.; SHORE, R.; LI, G.; SU, L.; JIN, X.; MELIKIAN, A. A.; ROY, N.; CHEN, L. C.; WIRGIN, I.; COHEN, B.; YIN, S.; LI, Y.; MU, R. Biomarkers of benzene: urinary metabolites in relation to individual genotype and personal exposure. **Chemical Biological Interactions**, v. 153-154, p. 85-95, 2005.

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ed. ULBRA. 2003. 356p.

RODDI, N.; DUPONT, W. D.; MOORE, J. H.; PARL, F. F. Association of homozygous wild-type glutathione S-transferase M1 (GSTM1) genotype with increased breast cancer risk. **Cancer Res.**, v.64, p. 1233-1236, 2004.

ROJAS, M.; CASCORBI, I.; ALEXANDROV, K.; KRIEK, E.; AUBURTIN, G.; MAYER, L.; KOOP SCNEIDER, A.; ROOTS, I. BATSCH, H. Modulation of benzo(a)pyrene diol-epoxide-DNA adduct levels in human white blood cells by *CYP1A1*, *GSTM1* and *GSTT1* polymorphisms. **Carcinogenesis**, v. 21, p. 35-41, 2000.

RONIS, M. J. J.; LINDROS, K.O.; INGELMAN-SUNDBERG, M. The CYP2E1 subfamily. In: IOANNIDES, C. (Ed.). **Cytochrome P450: metabolic and toxicological agents**, Boca Raton FL: CRC Press, 1996. p. 212-239.

ROSSI, A .M.; GUARNIERE, C.; ROVESTI, S. Genetic polymorphisms influence variability in benzene metabolism in humans. **Pharmacogenetics**, v.9, p.445-451, 1999.

ROTHMAN, N. , SMITH , M.; HAYES , R. B. ; TRAVER , R. D. ; HOENER , B. A. ; CAMPLEMAN , S. ; LI, G; DOSEMECI , M. ; LINET , M. ; ZHANG , L. ; XI , L. ; WACHOLDER , S. ; LU , W.; MEYER , K. B. ; TITENKO-HOLLAND , N. ; STEWART , J. T. ; YIN , S.; ROSS, D. Benzene poisoning, a risk factor for hematologic malignancy, is associated with the NQ01 <sup>609</sup>C->T mutation and rapid fractional excretion of chlorzoxazone. **Cancer Res.**, v. 57, p.2839-2842, 1997.

SCHNEIDER, J.; BERNGES, U.; PHILIPP, M.; WOITOWITZ, H. J. *GSTM1*, *GSTT1*, and *GSTP1* polymorphisms and lung cancer risk in relation to tobacco smoking. **Cancer Letters**, v. 208, p. 65-74, 2004.

SEPEHR, A.; KAMANGAR, F.; ABNET, C. C.; FAHIMI, S.; POURSHAMS, A.; POUSTTCHI, H.; ZEINALI, S.; SOUTODEH, M.; ISLAMI, F.; NASROLLAHZADEH, D.; MALEKZADEH, R.; TAYLOR, P. R.; DAWSEY, S. M. Genetic polymorphismss in three Iranian populations with different risks of esophageal cancer, na ecologic comparison. **Cancer Letters**, v. 123, n. 2, p.195-202, 2004.

SILVA, M. C.; GASPAR, J; SILVA, I. D.; FABER, A.; RUEFF, J. *GSTM1*, *GSTT1* and *GSTP1* genotypes and the genotoxicity of hidroquinone in human lymphocytes. **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 43, p. 258-264, 2004.

SIMIOLI, P.; LUPI, S.; GREGÓRIO, P.; SIWINSKA, E.; MIELZYNSKA, D.; CLONFERO, E.; PAVANELLO, S. Non-smoking coke oven workers show an occupational PAH exposure-related increade in urinary mutagens. **Mutat. Res.**, v. 562, p. 103-110, 2004.

SMITH, C. J.; BOMBICK, D.W.; RYAN, B.A.; MORGAN, W. T.; DOOLITTLE, D.J. Urinary mutagenicity in nonsmokers following exposure to fresh diluted sidestream cigarette smoke.

**Mutat. Res.**, v. 470, p. 53-70, 2000.

TANAKA, E.; TERADA, M.; MISAWA, S. Cytochrome P4502E1: it's clinical and toxicological role. **J. Clin. Pharm. Ther.**, v.25, n. 3, p.165-175, 2000.

TEIXEIRA, J.P.; GASPAR, J.; MARTINHO, G.; SILVA, S., RODRIGUES, S.; MAYAN O., MARTIN, E.; FARMER, P. B.; RUEFF, J. Aromatic DNA adduct levels in cokeoven workers: correlation with polymorphisms in genes GSTP1, GSTM1, GSTT1 and CYP2A1. **Mutat. Res.** V. 517, p. 147-155, 2002.

TEIXEIRA, J. P.; GASPAR, J.; SILVA, S.; TORRES, J.; SILVA, S. N.; AZEVEDO, M. C.; NEVES, P.; LAFFON, B.; MAYAN, O.; FARMER, P. B.; RUEFF, J. Occupational exposure to styrene: modulation of cytogenetic damage and levels of urinary metabolites of styrene by polymorphisms in genes CYP2E1, EPHX1, GSTM1, GSTT1 and GSTP1. **Toxicology**, v. 195, p. 231-242, 2004.

TERELIUS, Y.; LINDROS, K. O.; ALBANO, E.; INGELMAN-SUNDENBERG, M. Isozyme specificity of cytochrome P450-mediated hepatotoxicity. In; REIN, H.; RAUCKPAUL, K. (Eds), **Frontiers of biotransformation**. Berlim: Akademie Verlag, 1978.v.8, p. 186-233.

TUIMALA, J.; SZEKELY, G.; WIKMAN, H.; JÄRVENTAUS, H.; HIRNOVEN, A.; GUNDY, S.; NORPPA, H. Genetic polymorphisms of DNA repair and xenobiotic-metabolizing enzymes:

effects on levels of sister chromatid exchanges and chromosomal aberrations. **Mutat. Res.**, v. 554, p. 319- 333, 2004.

VALENT, G.V.; SATO, M. I. Z.; COELHO, M. C.; COIMBRÃO, C. A. Monitoring São Paulo state river for mutagenic activity using the Ames test. **Environ. Toxicol. Water Qual.**, v. 8, p. 371-381, 1993.

VALOTI, M.; FUSI, F.; FROSINI, M.; PESSINA, F.; TIPTON, K. F.; SGARAGLI, G. P. Cytochrome P450-dependent N-dealkylation of L-deprenyl in C57BL mouse liver microsomes: effects in vivo pre-treatment with ethanol, phenobarbital, beta- naphthoflavone and L-deprenyl. **Eur. J. Pharmacol.**, v.391, n.3, p.1999-206, 2000.

VARGAS, V. M. F.; MOTTA, V. E. P.; HENRIQUES, J. A. P. Mutagenic activity detected by the Ames test in river water the influence of petrochemical industries. **Mutat. Res.**, v.319, p. 31-45, 1993.

VARELLA, S. D.; POZETTI, G. L.; VILEGAS, W.; VARANDA, E. A. Mutagenic activity of sweepings and pigments a household-was factory assayed with *Salmonella typhimurium*. **Food Chem.Toxicol.**, v.42, p. 2029-2035, 2004a.

VARELLA, S. D.; POZETTI, G. L.; VILEGAS, W.; VARANDA, E. A. Mutagenic activity in waste from na aluminum products factory in Salmonella/microsome assay. **Toxicol. in vitro**, v.18, p. 895-900, 2004b.

VERMEULEN, R.; BOS, R. P.; PERTIJS, J.; KROMHOUT, H. Exposure related mutagens in urine of rubber workers associated with inhalable particulate and dermal exposure. **Ocupp. Environ. Med.**, v.60, p. 97-103, 2003.

WAN, J.; SHI, J.; HUIN, L.; WU, D.; JIN, X.; ZHAO, N.; HUANG, W.; XIA, Z.; HU, G. Association genetic polymorphisms in CYP2E1, MPO, NQO1, GSTM1 and GSTT1 genes with benzene poisoning. **Environ. Health Perspect**, v. 110, p. 1213-1218, 2002.

WATANABE, M.; ISHIDATE, M. J.; NOHEMI, T. Sensitive method for detection of mutagenic nitroarenes and aromatic amines: new derivates of *Salmonella typhimurium* tester strains possessing elevated O-acetil-transferase levels. **Mutat. Res.**, v.234, p.337-348, 1990.

YAHAGI, T.; DEGAWA, M.; SEINO, Y.; MATSUSHRMA, T.; NAGAO, M.; SUGIMURA, T.; HASHRMOTO, Y. Mutagenicity of carcinogenic azo dyes and their derivates. **Cancer Lett.**, v.1, p.91-96, 1975.

YAMASAKI, E.; AMES, B. N. Concentration of mutagens from urine by adsorption with the nonpolar resin XAD-2: cigarrete smokers have mutagenic urine. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.74, p.3555-3559, 1977.

YANG, X. R.; WACHOLDER, S.; XU, Z.; DEAN, M.; CLARK, V.; GOLD, B.; BROWN, L. M.; STONE, B. J.; FRAUMENI JR, J. .F.; CAPORASO, N. E. CYP1A1 and GSTM1 polymorphisms in relation to lung cancer risk in chineses women. **Cancer Lett.**, v. 124, n. 2, p. 197-204, 2004.

YIN, X. Z.; LIU, J. Z.; KONG, X. H.; CHU, J. H.; WANG, H.; XIAO, Z. X. Mutagenicity of urine from individuals exposed to LPG combustion products. **Biomed. Environ. Sci.**, v. 11, p. 251-257, 1998.

YOKOYAMA, A.; KATO, H.; YOKOYAMA, T.; TSUNINAKA, T.; MUTO, M.; OMOTI, T.; HANEDA, T.; KUMAGAI, Y.; IGAKI, H.; YOKOYAMA, M.; WATANABE, H.; FUKUDA, H.; YASHIMIZU, H. Polymorphisms of alcohol and aldehyde dehydrogenases and glutathione S-transferase M1 and drinking, smoking and diet in Japanese men with esophageal squamous cell carcinoma. **Carcinogenesis**, v.33, n. 11, p.1851-1859, 2002.

ZHANG, L. HAYES, R. B.; GUO, W.; McHALE, C. M.; YIN, S.; WIENCK, J. K.; O'NEILL, J. P.; ROTHMAN, N.; LI, G. L.; SMITH, M. T.; Lack increased genetic damage in 1,3-butadiene-exposed Chinese workers studied in relation to *EPHX1* and *GST* genotypes. **Mutat. Res.**, v.558, p. 63-74, 2004.

ABNT/2002

---

## ANEXO 1

Para Uso do Pesquisador

Número Código..... Data...../...../.....

### QUESTIONÁRIO DE SAÚDE PESSOAL

Por favor, leia as seguintes questões cuidadosamente e responda-as o mais completo e corretamente possível. A informação dada não será associada com seu nome em nenhum documento público e será revelada somente ao investigador responsável por este estudo. As respostas que você fornecer podem ter um papel direto na interpretação de nossos resultados.

#### HISTÓRIA PESSOAL

1.Nome:

.....

2.Idade:

.....

3.Data de nascimento:

...../...../.....

dia mês ano

4.Sexo: ( ) masculino ( )feminino

5. Grupo étnico:

a) cor da pele: .....

b) descendência: .....

6.Estado Civil: ( ) Casado(a) ( ) Solteiro(a) ( ) Divorciado(a)

7. Quantos filhos naturais? (não incluir adotados ou enteados e considerar as crianças que moram separadamente)

.....

#### HISTÓRIA PROFISSIONAL ATUAL E PASSADA

8.Trabalha atualmente? ( ) SIM ( ) Não

9. A quanto tempo você trabalha nessa companhia? .....

10. Se menos do que 10 anos, qual companhia trabalhou previamente e por quanto tempo?

.....

.....

11. Que tipo de trabalho você fez ou faz?.....

.....

.....

#### HISTÓRICO DE EXPOSIÇÃO

**12.** Você tem sido exposto, em seu emprego, a algum dos seguintes compostos químicos?

**12.a.** Quando você foi exposto pela primeira vez? (meses ou anos)

**12.b.** Quando você foi exposto pela última vez? (meses ou anos)

**12.c.** Quanto tempo em termos de dias, meses ou anos, no total, você foi exposto?

Asbestos (amianto)	<input type="checkbox"/> sim	1.....
	<input type="checkbox"/> não	2.....
		3.....

Radiação	<input type="checkbox"/> sim	1.....
	<input type="checkbox"/> não	2.....
		3.....

Produtos de Carvão	<input type="checkbox"/> sim	1.....
	<input type="checkbox"/> não	2.....
		3.....

Cinzas (de madeira, couro ou partículas finas de metal)	<input type="checkbox"/> sim	1.....
	<input type="checkbox"/> não	2.....
		3.....

Pesticidas/herbicidas	<input type="checkbox"/> sim	1.....
	<input type="checkbox"/> não	2.....
		3.....

Produtos de petróleo	<input type="checkbox"/> sim	1.....
	<input type="checkbox"/> não	2.....
		3.....

Tintura	<input type="checkbox"/> sim	1.....
	<input type="checkbox"/> não	2.....
		3.....

Solventes	<input type="checkbox"/> sim	1.....
	<input type="checkbox"/> não	2.....
		3.....

Outros químicos (especificar no item 15)	<input type="checkbox"/> sim	1.....
	<input type="checkbox"/> não	2.....
		3.....

**13.**Listar os nomes de algumas substâncias específicas às quais você sabe ter sido exposto por aspiração ou contato direto com a pele no trabalho ou no último ano ou dentro dos últimos dez anos.

**13.a.** Nos últimos 12 meses?



.....  
.....

**13.b.** Qual frequência mensal de exposição?

.....  
.....

Dentro dos últimos 10 anos?

**13.c.**

.....  
.....  
.....

.....**13.d.** Com que frequência mensal nesses últimos 10 anos?

.....  
.....

**14.** Listar alguma exposição a agentes químicos ou físicos que você se submeteu nos últimos 10 anos enquanto praticava um passatempo ou qualquer outra atividade em casa ou em outro ambiente não profissional. Consulte na lista da questão de número 13, mas não limite sua resposta somente aquelas substâncias.

**14.a.** Nos últimos 12 meses?

.....  
.....

**14.b.** Qual frequência mensal de exposição?

.....  
.....

Dentro dos últimos 10 anos?

**14.c.**

.....  
.....  
.....

.....**14.d.** Com que frequência mensal nesses últimos 10 anos?

.....  
.....

**HISTÓRIA DE CIGARRO**

**15.** Você fuma constantemente? ( ) sim ( ) não

Se **NÃO** vá para a questão 17.

Se **SIM:**

**a)** Há quanto tempo você fuma?.....

**b)** Você fuma atualmente? ( ) sim ( ) não

Se **NÃO**, quando parou de fumar? .....

Há quanto tempo parou de fumar? .....

Proceda para a questão 16

Você fuma cigarro com filtro? ( ) sim ( ) não

Qual sua marca usual? .....

c) Você usualmente fuma cigarros? ( ) sim ( ) não

Se sim, quantos maços por dia? ( ) menos que meio

( ) meio a 1 maço

( ) mais que 1: quantos maços/dia? .....

d) Você fuma freqüentemente charutos? ( ) sim ( ) não

Se sim quantos charutos por dia? ( ) 1 charuto

( ) 2-3 charutos

( ) 4 ou mais charutos

e) Você fuma freqüentemente cachimbo? ( ) sim ( ) não

Se sim, quantos ao dia? ( ) 1

( ) 2 a 3

( ) 4 ou mais

f) O que fumou no passado?

( ) cigarro

( ) charuto

( ) cachimbo

g) Você mastiga fumo freqüentemente? ( ) sim ( ) não

**16.** Você tem usado algum medicamento prescrito por um médico nos últimos 12 meses ( por exemplo: comprimidos para pressão sanguínea, antibióticos, antiinflamatórios, antidepressivos, insulina, tranqüilizantes, relaxantes musculares e etc.)?

( ) sim ( ) não

Se **sim**, qual o tipo de medicação, a dose, a quantidade/ dia e o período de tempo (mês de início e de término)?

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

**17.** Você usou alguma medicação não prescrita nos últimos 12 meses ( por exemplo: aspirina, antiácidos, antihistamínicos, sedativos, ou outras drogas)?

( ) sim ( ) não

Se **sim**, qual o tipo de medicação, a dose, a quantidade/ dia e o período de tempo (mês de início e de término)?

.....

.....

.....

.....

.....  
 .....  
 .....

**18.** Você toma alguma vitamina frequentemente ou tomou nos últimos 6 meses?

- ( ) sim                      ( ) não

Se **sim**, qual o tipo de vitamina, qual a dose e a quantidade por semana?

.....  
 .....  
 .....

**19.a.** Você já teve ou tem alguma das seguintes enfermidades?

- ( ) câncer
- ( ) hepatite
- ( ) mononucleose
- ( ) herpes
- ( ) aids
- ( ) meningite
- ( ) infecção bacteriana ou viral
- ( ) doença cardiovascular
- ( ) diabetes
- ( ) outras enfermidades

**b.** Se teve outras enfermidades, por favor, especifique qual, quando adoeceu e qual o tratamento indicado.

Doenças:

.....  
 .....  
 .....

Período de enfermo:

.....  
 ..... Tratamento  
 :

.....  
 .....  
 .....

**c.** Listar algumas outras doenças e os tratamentos que você se submeteu dentro dos últimos 12 meses (estes devem incluir gripes, resfriados, etc.)

Doenças:

.....  
 .....  
 .....

Período de enfermo:

.....  
 ..... Tratamento  
 :

.....  
 .....  
 .....

**d.** Listar algumas vacinações que você recebeu nos últimos 12 meses.

Tipo de vacina .....

Data administrada.....

**e.** Listar qualquer raio X diagnóstico ou terapêutico que você recebeu nos últimos 10 anos.

Reação ao raio X	Ano recebido
------------------	--------------

.....	.....
.....	.....
.....	.....

**f.** Você já fez algum raio X dentário?    ( ) sim    ( ) não

Se **sim**, ( ) no último mês

( ) nos últimos 6 meses

( ) nos últimos 6 – 12 meses

( ) mais de um ano atrás

**g.** Você fez alguma cirurgia no ano passado?    ( ) sim    ( ) não

Se **sim**, relacione o motivo e a data

.....  
 .....  
 .....

**h.** Você teve alguma febre alta durante o ano passado?    ( ) sim    ( ) não

Data	Doença associada	Medicação utilizada
.....	.....	.....
.....	.....	.....
.....	.....	.....
.....	.....	.....
.....	.....	.....

## HISTÓRIA DA DIETA

(deve refletir somente hábitos freqüentes)

**20.** Você come vegetais?    ( ) sim    ( ) não

**21.** Você come carne?    ( ) sim    ( ) não

**21.a.** Se **sim**, como você come freqüentemente os seguintes alimentos?

Dias/ semana

Nunca	1-2	3-4	5-6	todo dia
-------	-----	-----	-----	----------

Bife.....	.....	.....	.....	.....
Peixe.....	.....	.....	.....	.....
Frango.....	.....	.....	.....	.....
Porco.....	.....	.....	.....	.....
Outros.....	.....	.....	.....	.....
.....	.....	.....	.....	.....

- 21.b.** Você prefere o bife?  
 mau passado                       no ponto                       bem passado
- 22.** Você usa adoçante?  sim  não  
 Se **sim**, quanto por dia? .....
- 23.** Você toma bebida dietética?  sim  não  
 Se **sim**, quanto por dia? .....
- 24.** Comente a respeito de uma dieta específica não citada nas questões acima, por exemplo, dieta especial tal como, altas doses de proteína, baixos níveis de carboidratos, etc.  
 .....  
 .....  
 .....
- 25. a.** Você toma café?  sim  não  
**b.** Se **sim**, quantos por dia? .....
- c.** Descafeinado?  sim  não  
**d.** Se **sim**, quantos por dia? .....
- 26.a.** Você toma chá?  sim  não  
**b.** Se **sim**, quantos por dia? .....
- 27.a.** Você toma cerveja?  sim  não  
**b.** Se **sim**, por favor, indique sua média de consumo semanal:  
 1-6 garrafas ou canecas por semana  
 7-12 garrafas por semana  
 13-24 garrafas por semana  
 mais que 24 garrafas por semana, se esta categoria for escolhida, qual a sua média de consumo de cerveja por semana?..... garrafas/ canecas por semana
- 28.** Você bebe vinho?  sim  não  
 Se **sim**, por favor indicar a média de vinho consumido semanalmente:  
 1-4 copos por semana  
 5-8 copos por semana  
 9-16 copos por semana  
 mais do que 16 copos por semana, se esta categoria foi escolhida, qual a média de consumo de vinho semanal? .....copos por semana.
- 29.** Você bebe outra bebida alcoólica? ( excluindo cerveja e vinho)  sim  não  
 Se **sim**, por favor, indicar a média consumida semanalmente:  
 1-4 copos por semana  
 5-8 copos por semana  
 9-16 copos por semana  
 mais do que 16 copos por semana, se esta categoria foi escolhida, qual a média de consumo semanal? .....copos por semana.

## HISTÓRIA GENÉTICA

**30.** Você tem conhecimento de algum defeito de nascimento ou outra doença genética ou doença herdada que afeta seus pais, irmão, irmãs ou seus filhos?

( ) sim ( ) não

Se **sim**, por favor, especificar

.....  
.....  
.....

**31.a.** Você ou sua esposa já tiveram dificuldade em engravidar (por um período de pelo menos 12 meses) ou já foram diagnosticados como inférteis?

( ) sim ( ) não

Se **sim**, por favor, especificar ( indicar quando ocorreu a dificuldade ou quando recebeu o diagnóstico)

.....  
.....  
.....

**31.b.** Você já fez uma análise de sêmen? ( ) sim ( ) não

**32.** Você ou sua esposa já tiveram crianças com defeitos de nascimento ou outras doenças genéticas ou herdadas? ( ) sim ( ) não

Se **sim**, por favor, especificar (indicar quando a criança nasceu e a natureza da doença)

.....  
.....  
.....

**33.** Você e sua esposa podem relatar a ocorrência de algum tipo de aborto?

( ) sim ( ) não

**34.** Você tem um casal de gêmeos vivos?

( ) sim ( ) não

**35.** Sua esposa ou mãe do seu filho apresentou parto tranquilo?

( ) sim ( ) não

## ANEXO 2

Termo de consentimento livre e esclarecido:

Eu \_\_\_\_\_, RG \_\_\_\_\_, Estado  
Civil \_\_\_\_\_, Idade \_\_\_\_\_ anos, Residente na  
\_\_\_\_\_, nº \_\_\_\_\_,  
Complemento \_\_\_\_\_ Bairro \_\_\_\_\_, Cidade \_\_\_\_\_,  
Telefone \_\_\_\_\_,

Declaro ter sido esclarecido sobre os seguintes pontos:

1. O trabalho tem por finalidade avaliar na urina a presença de compostos químicos que causam mutação, provenientes da exposição a solventes orgânicos para avaliar a sensibilidade individual a esses compostos químicos.
2. Ao participar desse trabalho estarei contribuindo para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na metabolização dos solventes orgânicos.
3. Terei que doar para a realização dessa pesquisa, o(s) seguinte(s) material (ais) biológico (s) 1L de urina e 20 mL de sangue.
4. A minha participação como voluntário deverá ter a duração de um dia (coleta única).
5. Que não corro nenhum risco ao participar dessa pesquisa e que a coleta de material terá um desconforto mínimo.
6. Os materiais empregados na coleta serão descartáveis;
7. Deverei voltar ao laboratório todas as vezes em que houver solicitação dos pesquisadores desse projeto;
8. Não terei nenhuma despesa ao participar desse estudo;
9. Os procedimentos aos quais serei submetido não provocarão danos físicos ou financeiros e por isso não haverá a necessidade de ser indenizado por parte da equipe responsável por esse trabalho ou da Instituição (FCF/UNESP);
10. Meu nome será mantido em sigilo, assegurando assim a minha privacidade e se desejar, deverei ser informado sobre os resultados dessa pesquisa;

11. Deverei responder o Questionário de Saúde Pessoal fornecidos pelos pesquisadores.
12. Qualquer dúvida ou solicitação de esclarecimentos, poderei entrar em contato com a equipe científica pelo telefone 016- 3301-69-51, ou com a pesquisadora Soraya Duarte Varella pelo telefone 016-9761-02-07.
13. Para notificação de qualquer situação de anormalidade que não puder ser resolvida pelos pesquisadores deverei entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP, pelo telefone (0XX16) 3301-6897.

Diante dos esclarecimento prestados, concordo em participar do estudo “Análise da mutagenicidade urinária e susceptibilidade genética no monitoramento de indivíduos expostos a solventes orgânicos” , na qualidade de voluntário.

Araraquara, \_\_\_\_\_ 2003.

---

Assinatura do Voluntário



**ANEXO 3**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**CAMPUS DE ARARAQUARA**  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

*Seção Técnica Acadêmica*

Protocolo n° 18/2002 –CEP

Interessado: SORAYA DUARTE VARELLA

Orientador: Profa. Dra. ELIANA APARECIDA VARANDA

Projeto: MONITORAMENTO DE INDIVÍDUOS EXPOSTOS A SOLVENTES ORGÂNICOS  
PARA ANÁLISE DA INSTABILIDADE GENÉTICA E MUTAGENICIDADE URINÁRIA.

**Parecer n° 04/2003 – Comitê de Ética em Pesquisa**

O projeto “Monitoramento de indivíduos expostos a solventes orgânicos para análise da instabilidade genética e mutagenicidade urinária”, encontra-se adequado em conformidade com as orientações constantes da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS.

Por essa razão, o Comitê de Ética em Pesquisa desta faculdade considera o referido projeto estruturado dentro dos padrões éticos e é de PARECER FAVORÁVEL à sua execução.

Lembramos Vossa Senhoria da necessidade de entrega do relatório parcial em fevereiro de 2004 e do relatório final em agosto de 2005. No relatório final deverá constar o Termo de consentimento Livre Esclarecido dos sujeitos da pesquisa.

Araraquara, 18 de fevereiro de 2003.

---

Profª. Dra. REGINA MARIA BARRETO CICARELLI  
Coordenadora do CEP