

Ministério da Saúde
FIOCRUZ
ENSP



Escola Nacional de Saúde Pública
Sérgio Arouca
Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Estudo da Saúde dos Trabalhadores e Ecologia Humana– CESTEHE
Mestrado em Saúde Pública
Subárea Saúde, Trabalho e Ambiente
Área Temática Toxicologia

**Determinação do Polimorfismo da Enzima GSTP1 em Trabalhadores Expostos à Sílica e
Associação com Silicose**

Aluna: Daniele Ramos Rocha
Orientadora: Prof.^a Dr.^a Rita Mattos

Rio de Janeiro
Abril/2010

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Estudo da Saúde dos Trabalhadores e Ecologia Humana– CESTEHE

Mestrado em Saúde Pública

Subárea Saúde, Trabalho e Ambiente

Área Temática Toxicologia

**Determinação do Polimorfismo da Enzima GSTP1 em Trabalhadores Expostos à Sílica e
Associação com Silicose**

Aluna: Daniele Ramos Rocha

Banca Examinadora:

Titulares: Dr. José Carlos Pelielo de Mattos

Dr. Hermano Albuquerque de Castro

Suplentes: Dr. Adriano Caldeira de Araújo

Dr^a. Paula de Novaes Sarcinelli

Dedico essa dissertação de mestrado aos meus pais e ao meu amor, Rafael, que sempre estiveram ao meu lado me apoiando em todos os momentos. E a Deus pelas oportunidades colocadas em minha vida.

AGRADECIMENTOS

- Agradeço a Deus por ter-me dado forças para não desistir da caminhada.
- Aos meus pais pela formação e pelo grande apoio que me deram durante toda a vida.
- Ao meu amor, Rafael, pelo seu amor e incentivo ao longo desses anos, fundamentais para que eu chegasse até aqui.
- Aos meus irmãos, Karin e Felipe, aos familiares e aos amigos pelo carinho e apoio que me dedicaram nesse momento da minha vida.
- À minha orientadora, Rita, pela confiança, amizade, incentivo e grande conhecimento que tornou a sua orientação uma valiosa colaboração, não somente para a elaboração deste trabalho, mas para minha vida profissional e pessoal.
- À minha amiga Simone, que sem dúvida nenhuma fez um grande papel como co-orientadora, dando contribuições essenciais para elaboração do estudo. E a agradeço, principalmente, pela grande amizade.
- Aos meus colegas, do laboratório de indicadores de efeito (Helena, Ana Luiza, Isabele, Leandro, Vinício, Murata, Francisco e Mário), pelo apoio constante, amizade, conhecimentos compartilhados e, principalmente, pelo verdadeiro espírito de equipe apresentado.
- Um obrigado especial ao Ely pela paciência em me ajudar a fazer as estatísticas. E, também, pelo grande carinho e amizade.
- Aos meus amigos do mestrado (Daniel, Beatriz, Deise e Débora) por me ajudarem no cumprimento desta etapa.

RESUMO

A sílica é um composto natural formado pelos dois elementos mais abundantes na Terra - oxigênio e silício. A exposição a partículas de sílica cristalina induz a uma inflamação pulmonar crônica, que pode evoluir para fibrose pulmonar, acarretando na doença conhecida como silicose. O estresse oxidativo desempenha um papel importante na patogênese desta fibrose pulmonar. Sendo assim, a expressão de genes antioxidantes, como glutathione S-transferases (GSTs), são importantes componentes de proteção das células contra o estresse oxidativo e são conhecidas como genes altamente polimórficos, podendo contribuir para a susceptibilidade a silicose. O polimorfismo da GSTP1 A→G resulta na substituição do aminoácido isoleucina por valina, diminuindo, substancialmente, a atividade da enzima GSTP1. O estudo teve como objetivo a determinação do polimorfismo da enzima GSTP1 em trabalhadores expostos à sílica e associação com silicose. A população foi composta por 82 trabalhadores expostos à sílica oriundos, principalmente, da indústria naval. O polimorfismo da GSTP1 foi analisado por PCR-RFLP. Como resultado verificou-se que 31,6% dos trabalhadores tinham genótipo A/A, 57,9% A/G e 10,5% G/G. Observou-se que a média da atividade enzimática da GST foi menor (1,58 U/mL enzima) em indivíduos com o alelo G em relação ao alelo A (1,84 U/mL de enzima). Trabalhadores expostos à sílica portadores do alelo G mostraram um maior risco de desenvolver silicose, embora os resultados não tenham sido significativos, provavelmente, em função do universo amostral. Os indivíduos portadores do alelo G tiveram níveis menores na atividade da GST, independente do genótipo das enzimas GSTM1 e GSTT1. Em conclusão, estudos adicionais devem ser realizados para determinar o polimorfismo da GSTP1 em populações expostas à sílica em comparação com populações não-expostas, pois os resultados deste trabalho sugerem a utilização da determinação do polimorfismo da GSTP1, no processo de avaliação da exposição à sílica, como uma ferramenta complementar na identificação de subgrupos mais susceptíveis ao desenvolvimento da doença silicose.

Palavras-chaves: Silicose, Susceptibilidade, GSTP1

ABSTRACT

Silica is the natural compound of the two most abundant elements on Earth - oxygen and silicon. Exposure to crystalline silica particles induces chronic lung inflammation, which may progress to lung fibrosis, a disease known as silicosis. The oxidative stress plays an important role in the pathogenesis of pulmonary fibrosis. In this respect, the expression of antioxidant genes such as glutathione S-transferases (GSTs) are important to protect cells from oxidative stress and they are known as highly polymorphic genes, that may contribute to silicosis susceptibility. The GSTP1 A→G polymorphism results in amino acid substitution isoleucine for valine which substantially diminishes GSTP1 enzyme activity. The objective of study was the determination of enzyme GSTP1 polymorphism in workers exposed to silica and association with silicosis. The population was composed of 82 workers exposed to silica coming mainly from the shipbuilding industry. GSTP1 polymorphism was analyzed by PCR-RFLP. As a result it was found that 31,6% of workers had genotype A/A, 57,9% A/G and 10,5% G/G. It was observed that the mean enzyme activity of GST was lower (1.58 U / mL enzyme) in individuals with allele G compared with allele A (1.84 U / mL enzyme). Workers exposed to silica with allele G showed a higher risk of developing silicosis, although the results had not been significant, probably because of sample size. Individuals with allele G had lower levels of GST activity, independent of the genotype of GSTM1 and GSTT1 enzymes. In conclusion, further studies to determine the polymorphism of GSTP1 should be conducted in populations exposed to silica compared with non-exposed populations, because the results in this paper suggest the use of the determination of the polymorphism of GSTP1, in the process of evaluating the exposure to silica, as a complementary tool in the identification of subgroups more likely to develop the disease silicosis.

Palavras-chaves: Silicosis, Susceptibility, GSTP1

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1: Valores recomendados e limites de exposição ocupacional para a sílica. Dados do ano de 2005.	04
Tabela 2: Frequências dos genótipos nulos de GSTM1 e GSTT1 em indivíduos euro e afro-brasileiros do Rio Grande do Sul.	16
Tabela 3: Características sócio-demográficas da população estudada.	31
Tabela 4: Nível da atividade da enzima GST na população de trabalhadores expostos à sílica.	34
Tabela 5: Nível da enzima GST nas diferentes categorias da silicose na população de trabalhadores expostos à sílica.	35
Tabela 6: Frequência genotípica da GSTP1 em relação à descendência.	38
Tabela 7: Análise do risco de desenvolver silicose em relação aos genótipos da GSTP1.	40
Tabela 8: Relação entre os genótipos GSTM1 e GSTT1 com a atividade da GST.	43
Tabela 9: Relação dos genótipos da GSTT1 com os genótipos da GSTP1.	44
Tabela 10: Relação dos genótipos da GSTM1 com os genótipos da GSTP1.	45

LISTAS DE QUADROS

- Quadro 1:** Tamanho das bandas referente aos diferentes genótipos da GSTP1. 25
- Quadro 2:** Seqüências de *primers* e tamanho das bandas utilizadas na reação de PCR. 26

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1: Nódulos silicóticos e alvéolos, relativamente preservados em microscopia com aumento fraco.	06
Figura 2: Em microscopia de luz polarizada, as partículas de sílica brilham intensamente e o restante do campo fica escuro.	06
Figura 3: Resposta celular à exposição à sílica	11
Figura 4: Gene GSTM constituído de 5 variantes: GSTM1, GSTM2, GSTM3, GSTM4 e GSTM5.	14
Figura 5: Gene GSTT constituído de 2 variantes: GSTT1 e GSTT2.	15
Figura 6: O gene da GSTP1 constituído de 7 exons.	17
Figura 7: Distribuição dos trabalhadores expostos à sílica segundo as categorias radiológicas da doença.	32
Figura 8: Distribuição dos distúrbios respiratórios avaliados por espirometria no grupo exposto à sílica.	33
Figura 9: Eletroforese em gel de agarose 2%: PCR GSTP1.	36
Figura 10: Eletroforese em gel de agarose 3.5%: genotipagem GSTP1.	37
Figura 11: Comparação das médias de atividade da GST com os indivíduos com alelo A e G.	39
Figura 12: Eletroforese em gel de agarose 2%: genotipagem GSTM1 e GSTT1.	41
Figura 13: a) Comportamento da atividade da enzima GST em função do genótipo da GSTM1. b) Comportamento da atividade da enzima GST em função do genótipo da GSTT1.	43

SIGLAS E ABREVIATURAS

A - adenina

ACGIH - *American Conference of Governmental Industrial Hygienists* (Conferência Americana de Higienistas Industriais Governmentais)

BPDE - benzopireno diol epóxido

CDC - *Centers for Disease Control* (Centro de Controle de Doença)

CDNB - 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno

CEP - Conselho de Ética em Pesquisa

CESTEH - Centro de Estudo da Saúde Trabalhador e Ecologia Humana

DNA - *deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico)

ENSP - Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca

ERN - espécie reativas de nitrogênio

ERO - espécie reativa de oxigênio

FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz

G - guanina

GSH - Glutathiona

GST - glutathionas S-transferases

GSTM1 - glutathiona S-transferase M1

GSTP1 - glutathiona S-transferase P1

GSTT1 - glutathiona S-transferase T1

IARC - *International Agency for Research on Cancer* (Agência Internacional de Pesquisa do Câncer)

IL-12b - interleucina 12b

Ile - isoleucina

Kb - quilobases

LEO - Limite de Exposição Ocupacional

NIOSH - *National Institute for Occupational Safety and Health* (Instituto Nacional de Saúde e Segurança Ocupacional)

NR-15 - Norma Regulamentadora 15

OIT/2000 - Organização Internacional do trabalho/2000

OSHA - *Occupational Safety & Health Administration* (Administração de Segurança e Saúde Ocupacional)

pb - par de base

PCR - *Polymerase Chain Reaction* (reação em cadeia de polimerase)

PCR-RFLP - *Polymerase Chain Reaction-restriction Fragment Length Polymorphism* (reação e, cadeia de polimerase - polimorfismo do tamanho do fragmento de restrição)

PDD-S - purificado de proteína S

PNES - Programa Nacional de Eliminação da Silicose

REL-TWA - *recommended exposure limit-time-weighted average* (Limite de exposição recomendada – tempo de exposição tolerada)

SNPs - *single nucleotide polymorphisms* (polimorfismo de base única)

TEL - TWA - *permissible exposure limit-time-weighted average* (limite de exposição permitido - tempo de exposição tolerada)

TEM - Ministério do Trabalho e Emprego

TLV-TWA - *threshold limit value- limit-time-weighted average* (limite de tolerância - tempo de exposição tolerada)

Val - valina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
1.1 Sílica	01
1.2 Exposição à Sílica	01
1.3 Silicose	04
1.4 Diagnóstico da Silicose	08
1.5 Mecanismo Celular e Molecular da Silicose	10
1.6 Glutathionas S-Transferases (GSTs)	12
1.7 Polimorfismos Metabólicos e Susceptibilidade Genética	12
1.8 Polimorfismo da Glutathionas S-Transferase P1	16
2. OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo Geral	19
2.2 Objetivos Específicos	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1 Amostra Populacional	20
3.2 Avaliação Física e Clínica	20
3.2.1 Exame Físico e Questionários	20
3.2.2 Exames Radiográficos do Tórax	21
3.2.3 Exame de Escarro (BAAR)	21
3.2.3 Teste Espirométrico	21
3.2.4 Coleta das Amostras de Sangue	22
3.3 Materiais	22
3.3.1 Reagentes	22
3.3.2 Equipamentos	23
3.4 Extração de DNA Genômico Humano	23
3.5 Determinação do Polimorfismo da GSTP1	24
3.5.1 Digestão com a enzima de restrição <i>ALW26I</i>	25
3.6 Determinação do Genótipo da GSTM1 e GSTT1	26
3.7 Determinação da Atividade da GST	27

3.8 Estatística	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1 Características da População	29
4.2 Avaliação clínica da população	32
4.3 Determinação dos nível da enzima GST	34
4.4 Determinação do polimorfismo da enzima GSTP1	36
4.5 Determinação dos polimorfismos das enzimas GSTM1 e GSTT1	41
4.6 Relação entre os genótipos da GSTM1, GSTP1 e GSTT1	43
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	46
6. CONCLUSÕES	47
7. ANEXO	48
5. BIBLIOGRAFIA	54

1. INTRODUÇÃO

1.1 Sílica

O silício (Si) é o segundo elemento mais abundante na crosta terrestre depois do carbono. Um átomo de Si combinado com dois átomos de oxigênio (O₂) forma o dióxido de silício, ou, como é mais comumente chamado, a sílica (SiO₂). A sílica é uma substância quimicamente inerte e pode ser de origem mineral, biogênica ou sintética^{1,2,3}.

Existem duas formas de sílica: a não-cristalina (amorfa) e a cristalina, que quando combinadas com metais (alumínio, ferro, manganês e sódio) e óxidos formam silicatos, correspondendo a 60% de todo silício presente na Terra. Embora não seja inerte, a sílica amorfa é menos tóxica do que a cristalina.

A sílica cristalina pode ser encontrada na areia e em diversas rochas (arenito, granito e sliex) e apresenta vários tipos, como o quartzo, a cristobalita, a trimidita, a noganita, a kealita, tendo todos a mesma composição química, mas diferentes arquiteturas atômicas, o que lhes confere diferentes propriedades físicas. A forma mais comum é o quartzo, que corresponde a, aproximadamente, 12% do peso da crosta terrestre⁴.

1.2 Exposição à Sílica

A exposição à sílica cristalina ocorre, principalmente, a partir das atividades que necessitam do manuseio de material proveniente da superfície terrestre. As principais atividades ocupacionais silicogênicas no mundo são: mineração, indústria naval (jateamento de areia), trabalhos autônomos como o de artesãos e vidraceiros, metalurgia e trabalhos em pedreiras. No estado do Rio de Janeiro, a prática de jateamento de areia foi proibida, pela Lei nº 1979 de 23 de março de 1992. E a partir de 2005, a portaria 99 de outubro de 2004 do Ministério do Trabalho e

Emprego proibiu, em todo o território nacional, as atividades de jateamento de areia de qualquer tipo^{5,6}.

Apesar dos riscos conhecidos, a exposição à sílica continua elevada, mesmo em países desenvolvidos. No Brasil, o número de trabalhadores expostos ocupacionalmente à sílica está estimado em, aproximadamente, seis milhões. Sendo quatro milhões na construção civil, quinhentos mil na mineração e garimpo e mais de dois milhões em indústrias de transformação de minerais, metalurgia, indústria química, da borracha, cerâmicas e vidro. Com isso, o número de trabalhadores expostos representa 14,6% do total de trabalhadores inseridos no mercado formal^{3,7,8}.

A inalação de partículas de sílica está associada ao desenvolvimento de doenças como a silicose, doença pulmonar obstrutiva crônica, câncer de pulmão, insuficiência renal e aumento do risco de tuberculose pulmonar e de doenças ligadas ao colágeno. Desde 1996, a sílica cristalina inalada, sob a forma de quartzo e cristobalita, é considerada uma substância carcinogênica para humanos (grupo 1) pela *International Agency for Research on Cancer (IARC)*^{8,9,10,11}.

Para evitar a respiração de poeira de sílica, algumas medidas de controle da saúde do trabalhador podem ser adotadas pela empregadora, tais como: mudança da matéria-prima, adoção de processos ou operações que não produzam poeira, umidificação do local para evitar que a poeira se espalhe pelo ambiente, instalação de um sistema de ventilação local exaustora, limpeza do local por lavagem ou por aspiração, realização de manutenções preventivas e corretivas em todos os equipamentos operacionais, sinalização e rotulagem da área e de produtos que contenham sílica, monitoramento ambiental, utilização de proteção respiratória para o trabalhador, realização de exames periódicos, limitação de tempos de exposição e treinamentos periódicos¹².

O limite de exposição representa a concentração da substância permitida, com base nos efeitos à saúde e no período de tempo para a comparação com o limite permitido. Os limites são utilizados como guias de orientação para a prevenção dos riscos à saúde. Vários países estabelecem seus próprios valores recomendados de limites de exposição ou adotam os de instituições de outros países como, por exemplo, *National Institute for Occupational Safety and Health* (NIOSH), *American Conference of Governmental Industrial Hygienists* (ACGIH) ou *Occupational Safety & Health Administration* (OSHA). O Brasil utiliza o limite de tolerância (LT), para sílica cristalizada, na forma de quartzo, preconizado pela Norma Regulamentadora 15 (NR-15), anexo 12, porém o Programa Nacional de Eliminação da Silicose (PNES) preconiza a revisão desse limite, considerando este agente químico como carcinogênico^{7,13,14,15}. A Tabela 1 mostra os limites de exposição à sílica das agências citadas acima.

Um dos objetivos do PNES é a redução, significativa, das taxas incidência da doença até 2010 e a sua total erradicação como um problema de Saúde Pública até o ano de 2030, tendo como uma das metas a promoção de estudos e pesquisas sobre medidas e estratégias eficazes que evite ou controle a exposição de trabalhadores a poeiras atmosféricas⁷.

Tabela 1: Valores recomendados e limites de exposição ocupacional para a sílica. Dados do ano de 2005¹⁴.

Instituição	Nomenclatura	Substância	Valor Recomendado ou LEO* (mg/m ³)
NIO SH	REL-TWA (<i>recommended exposure limit-time-weighted average</i>) Jornada 10 horas diárias ou 40 horas semanais	Sílica cristalina na forma de quartzo, tridimita ou cristobalita como poeira na fração respirável	REL= 0,05
OSHA	TEL-TWA (<i>permissible exposure limit-time-weighted average</i>) Jornada 8 horas diárias ou 40 horas semanais	Sílica cristalina respirável na forma de quartzo	TEL= 10/ %SiO ₂ + 2
		Sílica cristalina respirável na forma de tridimita ou cristobalita	TEL= metade do valor calculado para quartzo
ACGIH	TLV-TWA (<i>threshold limit value- limit-time-weighted average</i>) Jornada 8 horas diárias ou 48 horas semanais	Sílica cristalina respirável na forma de quartzo, tridimita ou cristobalita	TLV = 0,05
TEM (Ministério do Trabalho e Emprego/Brasil) NR-15, Anexo 12	Limite de tolerância Jornada 8 horas diárias ou 48 horas semanais	Sílica cristalina respirável na forma de quartzo como poeira na fração respirável	LT= 8/ %SiO ₂ +2

* LEO: Limite de Exposição Ocupacional

1.3 Silicose

A doença silicose é a pneumoconiose mais freqüente, sendo, por isso, de grande relevância para a Saúde Pública. As pneumoconioses representam um conjunto de doenças pulmonares relacionadas à exposição às poeiras minerais nos ambientes de trabalho, reunindo um grupo de doenças respiratórias conhecidas pelo agente principal causador³.

A silicose é considerada uma das mais antigas doenças ocupacionais conhecida, oriunda da inalação de poeira de sílica cristalina, sendo a mais comum causada pela partícula em forma de quartzo. No Brasil e no mundo, esta doença constitui um problema de Saúde Pública que já poderia ter sido erradicada com o uso de medidas de controle nos ambientes ocupacionais^{3,8}.

A prevalência desta doença continua elevada por causa da dificuldade de se eliminar a exposição à poeira nos ambientes de trabalho. Isso ocorre por diversos fatores interdependentes, como: baixo nível de investimento financeiro em controle ambiental dos processos de trabalho, fiscalização governamental inadequada e insuficiente, ausência de um cadastramento específico das indústrias que manipulam matérias-primas contendo sílica, ausência de percepção de risco por parte dos trabalhadores, não priorização do problema por parte dos sindicatos de trabalhadores e baixa qualidade dos programas de controle médico e de saúde ocupacional praticados pelas empresas empregadoras, o que leva a um baixo índice de diagnósticos precoces¹⁶.

No Brasil, a silicose tem sido descrita desde 1939 e, atualmente, é a pneumoconiose com maior prevalência. No entanto, o número de doentes não é completamente conhecido. Estudos recentes permitem aproximações pontuais sobre a ocorrência da doença em algumas atividades industriais. Altas prevalências de silicose foram encontradas em trabalhadores da indústria de construção naval (23,6%) e em cavadores de poços artesianos (17,4%). Os registros oficiais da Previdência Social, mesmo considerando-se a alta subnotificação, revelaram a ocorrência de dois casos de silicose para 10.000 contribuintes no ano de 2003^{8,17,18}.

Com relação a anatopatologia da doença é observado, no parênquima pulmonar, tecido fibroso e células inflamatórias (linfócitos, plasmócitos e macrófagos) que formam o chamado nódulo silicótico¹⁹. Nas figuras 1 e 2, são mostrados os nódulos silicóticos e alvéolos com estruturas relativamente preservadas e as partículas de sílica utilizando microscopia de luz polarizada, respectivamente.

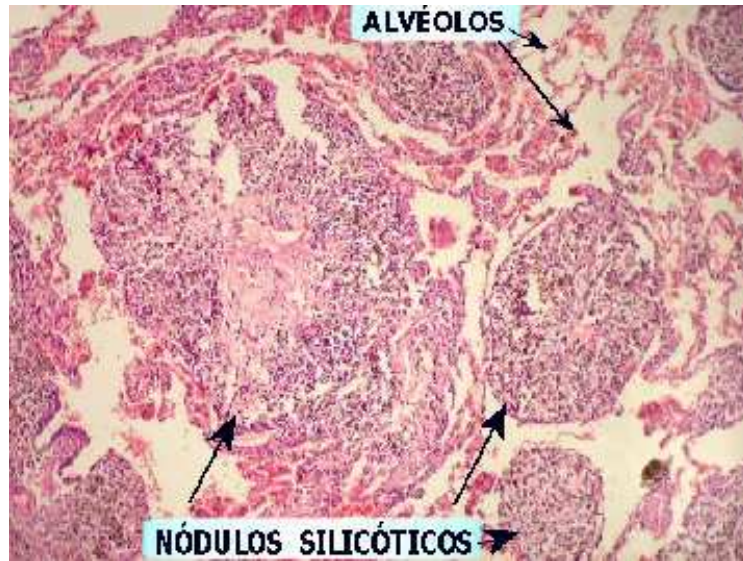


Figura 1: Nódulos silicóticos e alvéolos, relativamente preservados em microscopia.

Fonte: FCM-UNICAMP²⁰.

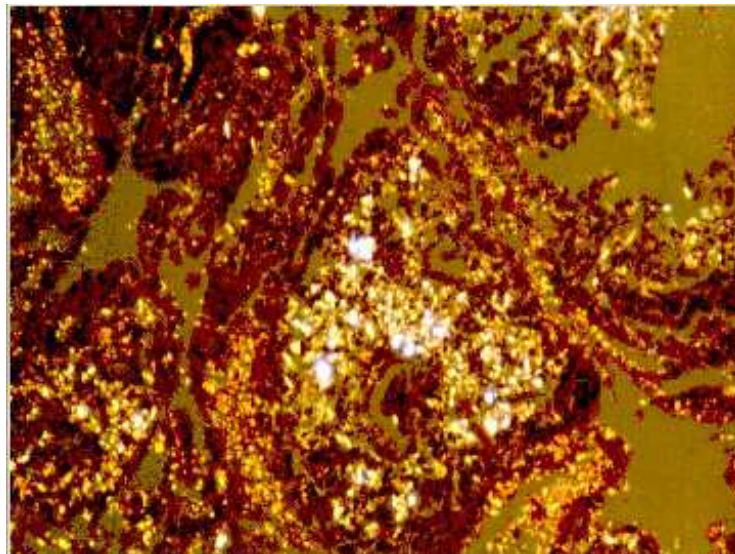


Figura 2: Em microscopia de luz polarizada, as partículas de sílica brilham intensamente e o restante do campo fica escuro.

Fonte: FCM-UNICAMP²⁰.

Os principais sintomas da doença silicose são: tosse, produção de escarro e dificuldade respiratória grave. A fibrose pulmonar reduz o leito vascular capilar do pulmão, podendo causar hipertensão na circulação pulmonar, resultando, assim, na hipertrofia e dilatação do ventrículo direito do coração²⁰.

Dependendo da intensidade e duração da exposição, da natureza da partícula de sílica inalada, da presença ou não de materiais orgânicos ou inorgânicos na poeira, do fato das partículas serem recém quebradas, a silicose pode se apresentar com formas e graus diferentes: silicose simples (nodular), silicose aguda, fibrose maciça progressiva e fibrose intersticial difusa são exemplos^{3,21,22}.

Com relação ao fato das partículas serem recém quebradas, seja por conta de perfuração de poços ou por causa de jateamento, isso acaba por acarretar um maior número de radicais livres na superfície da sílica, sendo assim responsáveis por um maior estímulo à produção de substâncias oxidantes³.

Com relação ao diâmetro, a partícula de sílica pode se depositar em diferentes regiões do trato respiratório. A fração inalável das partículas, capaz de entrar pelas narinas e boca, têm diâmetro aerodinâmico menor do que 100 µm. O material particulado menor que 25 µm é capaz de entrar pela laringe e pelas vias superiores, penetrando nas vias aéreas dos pulmões. Já as partículas menores que 10 µm, ficam depositadas nos alvéolos pulmonares, onde ocorre a troca de gases pulmonares, causando, assim, efeito adverso no local, como, o desenvolvimento da silicose.

Com relação à intensidade e duração da exposição, Barazzutti²³ cita a *Labor Occupational Safety and Health Administration*, para classificar a silicose em três tipos:

Crônica: acontece depois de 10 ou mais anos de exposição a pequenas quantidades de pó de sílica;

Acelerada: é verificada depois de 5 a 10 anos de exposição a quantias moderadas de sílica cristalina;

Aguda: pode se desenvolver dentro de algumas semanas ou até cinco anos depois da exposição a concentrações altas de sílica cristalina.

1.4 Diagnóstico da Silicose

O diagnóstico da silicose é feito com o levantamento do histórico ocupacional de exposição à poeira mineral e radiografia com imagens compatíveis com o grau de evolução da doença. O histórico ocupacional da exposição deve ser o mais completo possível (tipo de trabalho, substâncias utilizadas no emprego). A determinação da relação da exposição com o início dos sintomas faz parte da abordagem diagnóstica das doenças respiratórias ocupacionais¹.

A radiografia é classificada de acordo com os padrões radiológicos da Organização Internacional do trabalho/2000 (OIT/2000), sendo qualificada quanto à profusão de lesões e o tipo de lesão. Quanto à profusão das lesões no parênquima pulmonar, estas são divididas em categorias de 0 a 3, que por sua vez são subdivididas em mais 3²⁶.

Categoria 0: Raios-X com leitura 0/-, 0/0 e 0/1

Categoria 1: Raios-X com leitura 1/0, 1/1 e 1/2

Categoria 2: Raios-X com leitura 2/1, 2/2 e 2/3

Categoria 3: Raios-X com leitura 3/2, 3/3 e 3/+

As radiografias 0/-, 0/0,0/1 são consideradas normais. A classificação 0/1 já apresenta pequenas opacidades, porém insuficientes para o diagnóstico. As categorias 1/0, 1/1, 1/2, 2/1, 2/2, 2/3, 3/2, 3/3, 3/+ estão em escala crescente de profusão. Na categoria 1, a profusão é baixa mas suficiente para o diagnóstico, porém são lesões localizadas. Na categoria 2, ocorre um início de alteração no desenho vascular. Na categoria 3, a vasculatura pulmonar está inteiramente alterada.

Quanto ao tipo, estas lesões são classificadas em opacidades redondas ou regulares e lineares ou irregulares. Utilizam-se duas letras separadas por uma barra²⁵.

As opacidades regulares são:

p: diâmetro médio inferior a 1,5 mm

q: diâmetro médio entre 1,5 e 3,0 mm

r: diâmetro médio entre 3,0 e 10,0 mm

As opacidades irregulares são:

s: espessura média inferior a 1,5 mm

t: espessura média entre 1,5 e 3,0 mm

u: espessura média entre 3,0 e 10,0 mm

De acordo com este critério, a radiografia do paciente é classificada como silicose quando está maior ou igual a 1/0. Porém muitas vezes, a radiografia não é de boa qualidade e não tão sensível, com isso não sendo possível realizar um diagnóstico precoce da doença. Embora não seja largamente utilizada, a tomografia computadorizada de alta resolução pode dar informações adicionais importantes, tanto na detecção precoce de pequenas opacidades quanto no estadiamento da doença e na identificação de possíveis complicações^{24,26}.

1.5 Mecanismo Celular e Molecular da Silicose

Uma vez instalada, a silicose é irreversível, mesmo que o indivíduo se afaste das fontes de contaminação. Sendo, a via respiratória a porta de entrada para as partículas de sílica, quando entram nos pulmões são fagocitadas pelos macrófagos alveolares. Após isto, dependendo da característica superficial das partículas, o processo pode se repetir ou provocar ativação de mais macrófagos e/ou levar a morte celular. Este ciclo de fagocitose e morte celular dá início ao processo inflamatório. Este processo faz com que os macrófagos sejam ativados, a nível celular e molecular, provocando a ativação dos fatores de transcrição e a liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs), fatores quimiotáticos, enzimas líticas, citocinas, fatores de crescimento. E ocorrem subseqüentes ciclos de ingestão e reingestão com recrutamento de macrófagos alveolares, neutrófilos e linfócitos que causam lesões e destruição do tecido, dando início à fase de reparação ou de instalação da fibrose (tecido cicatricial). Essas áreas cicatriciais não permitem a passagem normal de oxigênio para o sangue, os pulmões perdem a elasticidade e a respiração exige um maior esforço^{1,3}. Na figura 3, são ilustradas as principais etapas da resposta celular a exposição à sílica.

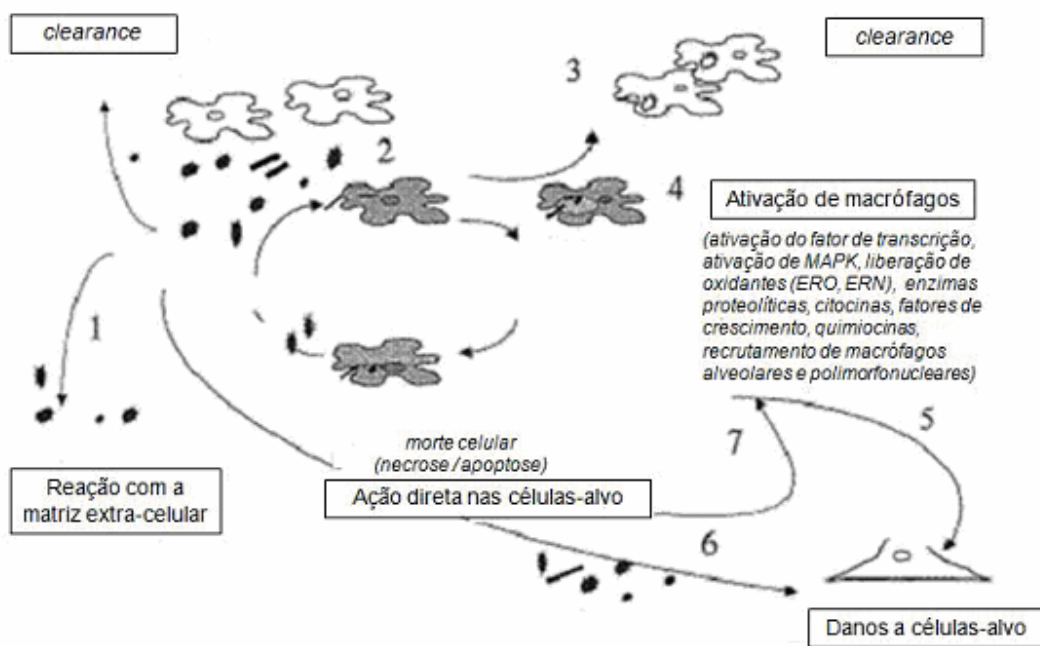


Figura 3: Resposta celular à exposição à sílica: (1): Interação com a matriz extra celular; (2): Fagocitose pelos macrófagos alveolares; (3): *Clearance*; (4): ativação e morte de macrófagos; (5): resposta celular por meio dos produtos liberados dos macrófagos; (6): ação direta das partículas de sílica às células; (7): geração de EROs e ERNs (Adaptado de Fubini & Hubbard²⁷).

O organismo humano sofre ação constante de EROs, ERNs e outros radicais livres gerados em processos inflamatórios, por alguma disfunção biológica ou ainda provenientes da alimentação. Esta ação pode causar peroxidação dos lipídios de membrana e agressão a macromoléculas como proteínas, enzimas, carboidratos e DNA. A produção em excesso destas partículas é combatida por antioxidantes, como as enzimas metabólicas glutatona S-transferases (GSTs). Sendo o desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes chamado de estresse oxidativo²⁸.

1.6 Glutathionas S-Transferases (GSTs)

As GSTs são enzimas diméricas e de fase II da biotransformação. Estas enzimas são produtos de uma família de genes localizados em diferentes cromossomos humanos, sendo separadas em classes: alpha, mu, pi, theta, sigma e kappa. Dentro de cada classe são encontradas variações, sendo as três mais estudadas: glutathion S-transferase M1 (GSTM1), glutathion S-transferase T1 (GSTT1) e glutathion S-transferase P1 (GSTP1)²⁹.

Dentre os sistemas de detoxificação, as enzimas GSTs possuem um importante papel na modificação de compostos eletrofílicos reativos tanto pela conjugação com os grupamentos glutathionas, como também por ligação com vários xenobióticos, tornando-os mais hidrofílicos, sendo, assim, mais facilmente excretados pela urina. Logo, as GSTs fornecem proteção contra compostos eletrofílicos (EROS, poluentes ambientais e agentes carcinogênicos)²⁹.

No caso da exposição à sílica, esta pode espontaneamente promover a formação de EROS, via reação radicalar, em solução aquosa (nos alvéolos pulmonares) ou após fagocitose por macrófagos. Os compostos eletrofílicos tóxicos formados são: $\text{SiO}_{2(s)}^\circ$, trióxido de silício ($\text{SiO}_{3(s)}^\circ$), cátion de silício (Si^+) e ânion superóxido ($-\text{O}_2^\circ$)^{27,30}.

1.7 Polimorfismos Metabólicos e Susceptibilidade Genética

A metabolização de compostos xenobióticos representa um dos mais importantes mecanismos de proteção das células. A grande variabilidade na capacidade de ativar ou inativar compostos com potencial tóxico pode ser influenciada pelos polimorfismos de genes que codificam enzimas de metabolização. Estes polimorfismos podem ser responsáveis por um metabolismo deficiente, eficiente ou ultra-rápido do xenobiótico. Sendo assim, dependendo do tipo de reação mediada por estas enzimas, tais polimorfismos poderão trazer vantagens ou desvantagens na susceptibilidade a certas patologias³¹.

Sob condições de exposição semelhantes, variações na sequência do DNA de alguns genes podem afetar o nível de expressão, a estrutura e a atividade catalítica de enzimas metabólicas de diferentes indivíduos. A variação genética no genoma humano é um fenômeno comum e dois indivíduos diferem entre si, aproximadamente, 1 par de base (pb) a cada 1000 pb analisadas. Sendo os polimorfismos de único nucleotídeo – SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) responsáveis por 90% das alterações genômicas e os 10% restantes ocorrem por inserções, deleções, repetições em *tandem* e microssatélites³².

Os SNPs têm sido identificados em genes responsáveis pelo metabolismo, proliferação celular, transporte, resposta inflamatória e reparo de DNA, estando relacionados com o desenvolvimento de algumas doenças, como, por exemplo, o câncer. O conhecimento destes polimorfismos pode determinar quais indivíduos são mais sensíveis à exposição a uma determinada substância química, sendo denominados indicadores de susceptibilidade que podem ser utilizados como ferramentas complementares no processo de avaliação de risco, fornecendo dados que podem ser usados para prever, precocemente, o desenvolvimento de doenças e também para implementação de programas de prevenção das mesmas^{33,34,35}.

Recentes estudos sugerem que o estresse oxidativo tem um importante papel na patogênese de fibrose pulmonar. Por isso, a expressão dos genes de moléculas do sistema antioxidante, como as GSTs, é importante na resposta pulmonar. Além disso, é sabido que os genes polimórficos contribuem para a susceptibilidade genética. Sendo, alguns dos genes polimórficos mais estudados: GSTM1, GSTT1 e GSTP1³⁶.

O gene da subfamília GSTM está localizado no cromossomo 1p13.3, contendo cerca de 100 Kb e possui 5 variantes: GSTM1, GSTM2, GSTM3, GSTM4 e GSTM5. A deleção do gene da GSTM1 resulta na não expressão da enzima GSTM1 em indivíduos homocigotos. A figura 4 apresenta o mapeamento detalhado do gene da GSTM mostrando que o gene da GSTM1, que

possui 8 exons, é flanqueado, isto é, ladeado por duas regiões quase idênticas de, aproximadamente, 4,2 quilobases (Kb). E que o alelo GSTM1 nulo surge da recombinação homóloga destas duas regiões, resultando na supressão de 16 Kb, a qual contém todo o gene da GSTM1³⁷.

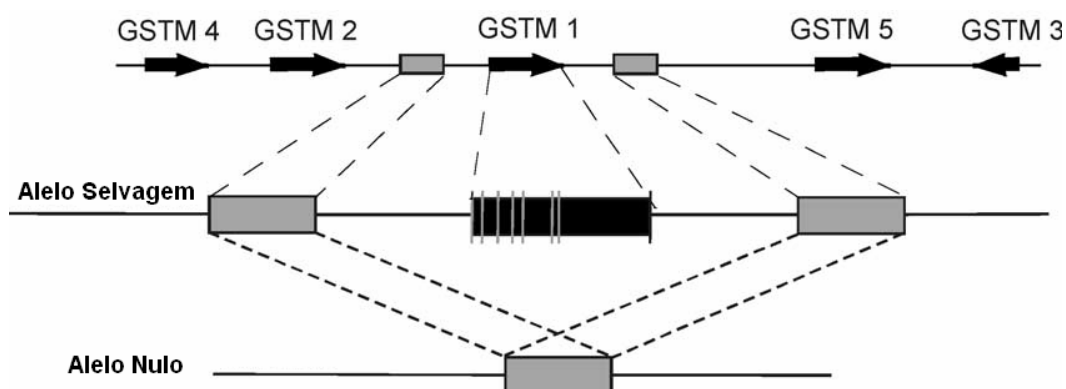


Figura 4: Gene GSTM constituído de 5 variantes: GSTM1, GSTM2, GSTM3, GSTM4 e GSTM5. GSTM1: formado por 8 exons (retângulo preto), sendo o alelo selvagem flanqueado por duas regiões quase idênticas (retângulos cinzas) enquanto que o alelo nulo é formado a partir da recombinação homóloga das duas regiões flanqueadas, resultando na supressão de 16kb que contém todo o gene (Adaptado de Parl³⁷).

A GSTM1 está, principalmente, envolvida na detoxificação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, solventes como o benzeno e outros mutagênicos. Indivíduos GSTM1-nulos por não apresentarem esta enzima, possuem um risco aumentado para efeitos de uma grande variedade de carcinógenos ambientais, sendo mais susceptíveis ao desenvolvimento de câncer. Este genótipo também foi positivamente associado com níveis altos de adutos de DNA^{38,39}.

A subfamília GSTT está localizada no cromossomo 22q11.2 e consiste de dois genes: GSTT1 e GSTT2, tendo, aproximadamente, 55% dos aminoácidos idênticos. O gene da GSTT1 consiste de 5 exons e é flangeada por duas regiões de 18kb (HA3 e HA5) que são 90% homólogas. Como mostrado na figura 5, o alelo GSTT1 nulo surge da recombinação homóloga das regiões HA3 e HA5, resultando na deleção de 54kb que contém todo o gene da GSTT1. O alelo nulo resulta na ausência de produção da enzima em indivíduos homozigotos³⁷.

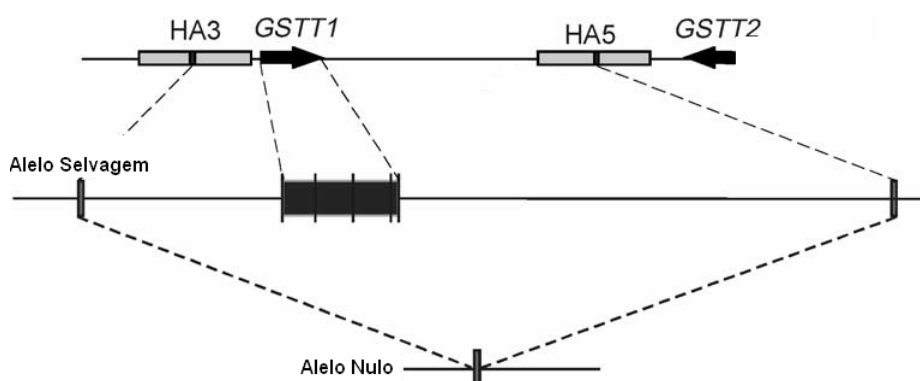


Figura 5: Gene GSTT constituído de 2 variantes: GSTT1 e GSTT2. GSTT1: formado por 5 exons (retângulo preto), sendo o alelo selvagem flangeado por duas regiões (HA3 e HA5) quase idênticas (retângulos cinzas) enquanto que o alelo nulo é formado a partir da recombinação homóloga das duas regiões flangeadas, resultando na deleção de 54kb que contém todo o gene (Adaptado de Parl³⁷).

A enzima GSTT1 está envolvida na detoxificação de uma série de compostos, tais como: pequenos hidrocarbonetos reativos (exemplo: diepoxibutano), halometanos sintéticos e outros químicos industriais⁴⁰.

A tabela 2 mostra o resultado de um estudo realizado, no Rio Grande do Sul, no qual os genótipos nulos para GSTM1 e GSTT1 apresentaram frequências diferentes quando foram comparados indivíduos euro e afro-brasileiros.

Tabela 2: Frequências dos genótipos nulos de GSTM1 e GSTT1 em indivíduos euro e afro-brasileiros do Rio Grande do Sul.

Polimorfismo	Euro-brasileiros (n*)	Afro-brasileiros (n)
GSTM1 nulo	0,500 (90)	0,340 (102)
GSTT1 nulo	0,211 (90)	0,280 (149)

* Número: n

Fonte: Kvitko *et al*⁴².

Estudos apontam que os genótipos GSTT1 e/ou GSTM1 nulos estão associados com o aumento do risco de câncer de bexiga, de pulmão, coloretal e de cabeça e pescoço, pois a ausência destas enzimas poderia reduzir a capacidade do organismo de detoxificar certos metabólitos reativos. Também há indícios de que indivíduos GSTT1/GSTM1 nulos estão mais propícios a um aumento nos níveis de adutos de DNA, de trocas de cromátides-irmãs e de mutações genéticas^{43,44,45}.

1.8 Polimorfismo da Glutathione S-Transferase P1

O gene da subfamília GSTP1 está localizado no cromossomo 11q13, contendo 2,8 Kb e 7 exons, sendo responsável por codificar a isoenzima P1, de 209 aminoácidos, que está, comprovadamente, envolvida no metabolismo de compostos halogenados, moléculas de baixo peso molecular e epóxidos reativos de alguns hidrocarbonetos aromáticos policíclicos³¹.

A GSTP1 é observada em maior concentração nos pulmões, esôfago e placenta. Nos pulmões, a enzima é mais expressa nos alvéolos, nos macrófagos alveolares e nos bronquíolos, e está associada com doença pulmonar crônica obstrutiva. Estudos apontam que o aumento da GSTP1 em células cancerosas, pode ajudá-las contra o estresse oxidativo induzido por citostáticos (drogas que evitam a multiplicação e o crescimento de células - quimioterapia) e, com isso, inibir a apoptose e levar ao aumento do tumor^{36,39}.

O polimorfismo mais estudado da GSTP1 é o que está envolvido na troca do nucleotídeo adenina (A) pela guanina (G) na posição +313 do exon 5, resultando na substituição do aminoácido, no códon 104, de isoleucina (Ile) por valina (Val), conforme mostrado na figura 6. Estes alelos formam três diferentes genótipos: A/A, A/G e G/G^{36,46}.

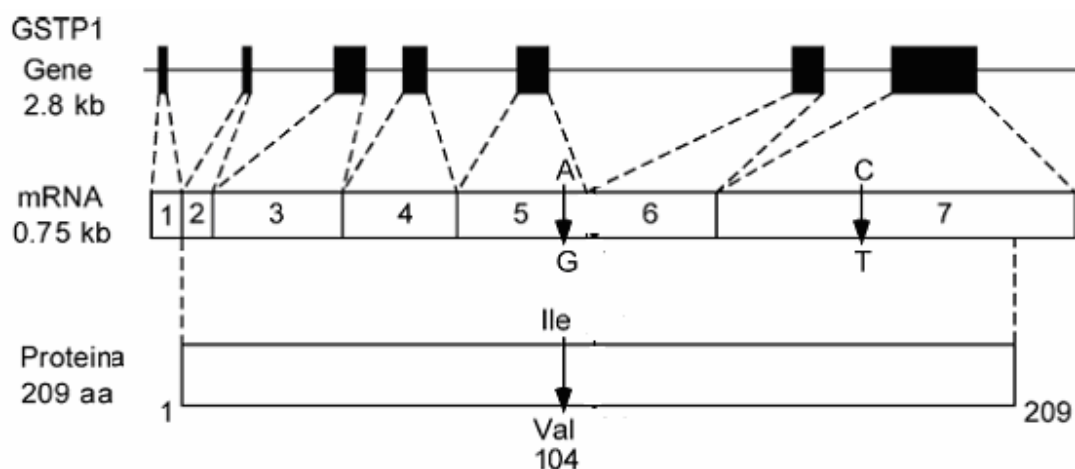


Figura 6: O gene da GSTP1 constituído de 7 exons. O polimorfismo ocorre através da troca do nucleotídeo adenina (A) pela guanina (G) no exon 5, resultando na substituição do aminoácido isoleucina por valina na posição 104. (Adaptado de Parl³⁷).

Alguns estudos têm mostrado que as isoformas apresentam diferenças na especificidade de ligação ao substrato e na estabilidade térmica. Tais alterações podem conferir diferentes atividades catalíticas, sendo demonstrado que o alelo G confere uma atividade catalítica aumentada em sete vezes para hidrocarbonetos aromáticos policíclicos diol epóxidos, porém três vezes menor para 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno, quando comparadas com as enzimas codificadas pelo alelo A^{47,48}.

Kvitko *et al*⁴² analisaram uma amostra de descendentes de europeus, oriundo do Rio Grande do Sul, sendo a distribuição encontrada de 52,2% para o genótipo A/A, 40% para A/G e 7,8% para G/G. E, em outro estudo, uma amostra de afro-brasileiros teve a distribuição genotípica de 47,8% para A/A, 42,6% para A/G e 9,6% para G/G⁴⁹.

A GSTP1 é conhecida por metabolizar muitos compostos carcinogênicos, como, por exemplo, o benzopireno diol epóxido (BPDE), o qual é um dos principais metabólitos carcinogênicos derivados da fumaça do cigarro. Alguns estudos realizados entre este metabólito e o alelo G da GSTP1, encontraram que a enzima tem sua atividade catalítica reduzida, e com isso, aumenta a susceptibilidade para o câncer^{39,50,51}.

Um estudo sobre o polimorfismo da GSTP1 e exposição à sílica mostrou que o alelo G está mais envolvido na predisposição ao desenvolvimento da silicose. Neste estudo, os autores reportam que a enzima GSTP1 não está envolvida, somente, na detoxificação, mas também na expressão da interleucina 12b (IL-12b)³⁶.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Este estudo teve como finalidade a determinação do polimorfismo da enzima GSTP1 em trabalhadores expostos à sílica e associação com silicose. Este trabalho está inserido em um estudo mais amplo que visa avaliar os parâmetros toxicogenéticos e de estresse oxidativo em trabalhadores expostos à sílica.

2.2 Objetivos Específicos

1. Levantamento dos dados sócio-demográficos e do histórico ocupacional de exposição da população estudada;
3. Determinação do polimorfismo da enzima GSTP1 na população estudada;
5. Determinação dos polimorfismos da GSTM1 e GSTT1 na população estudada;
6. Relação entre trabalhadores expostos silicóticos e não silicóticos e os polimorfismos.

3. MATERIAS E MÉTODOS

Este trabalho foi submetido ao Conselho de Ética em Pesquisa (CEP) da Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca/ Fundação Oswaldo Cruz (ENSP/FIOCRUZ), recebendo aprovação com parecer 95/07. As análises laboratoriais foram realizadas no setor de Indicadores Biológicos do Laboratório de Toxicologia do Centro de Estudo da Saúde Trabalhador e Ecologia Humana (CESTEH), que apresenta infra-estrutura para a execução de metodologias de caráter bioquímico e de biologia molecular.

3.1 Amostra Populacional

A população de estudo foi composta de trabalhadores expostos à sílica, acompanhados no Ambulatório do CESTEH/ENSP/FIOCRUZ. Os trabalhadores foram selecionados aleatoriamente, tendo todos idade superior a 18 anos e do sexo masculino. A participação de cada indivíduo foi voluntária com assinatura de um termo de consentimento livre e esclarecido. Ao aceitarem participar do estudo, os voluntários seguiram as seguintes etapas: responder a um questionário; exame clínico (anamnese, exame de escarro (BAAR), espirometria; radiografia de tórax) e, por fim, as coletas das amostras de sangue para as análises laboratoriais.

3.2 Avaliação Física e Clínica

3.2.1 Exame Físico e Questionários

O questionário foi aplicado com a finalidade de obtenção de informações sócio-demográficas (anexo 1) e sobre o histórico ocupacional de exposição e da saúde do trabalhador, sendo complementadas com o exame físico. Tendo ambos como propósito a avaliação do grau de acometimento dos indivíduos e a evolução clínica dos sintomas, além da identificação de outras co-morbidades e possíveis fatores de confundimento.

3.2.2 Exames Radiográficos do Tórax

A técnica radiológica utilizada seguiu os padrões preconizados pela OIT/2000²⁶. Com isso, as radiografias do tórax dos trabalhadores foram classificadas levando-se em conta à profusão das lesões e o tipo de lesão no parênquima pulmonar, sendo divididas em categorias de 0 a 3. Foram considerados alterados os Raios-X dos indivíduos em que a média da leitura era maior que 1/0.

3.2.3 Exame de Escarro (BAAR)

Para o diagnóstico da tuberculose foi utilizado o exame de escarro. Para isso, três amostras de escarro devem ser colhidas e analisadas pelo método baciloscópio. Amostras falsamente positivas se restringem a menos de 1% dos casos. A baciloscopia é um exame de fácil execução e deve ser realizada em todo o paciente que produza escarro espontaneamente ou induzido. Sua sensibilidade é de 75%, sendo estimado que sejam necessários de 10⁴ a 10⁵ bacilos/ml de escarro para ser possível a sua detecção ao microscópio óptico. A amostra de escarro deve ser coletada preferencialmente pela manhã, quando o paciente costuma apresentar uma maior expectoração, após acordar e realizar higiene oral, sendo encaminhada para exame de pesquisa direta de bacilo ácido-álcool resistente (BAAR) através de coloração específica. Para os pacientes que não conseguem espontaneamente produzir escarro, pode-se induzi-lo através de inalação de solução salina hipertônica.

3.2.3 Teste Espirométrico

A espirometria avalia a função ventilatória, refletindo dados sobre distensibilidade ou resistência elástica do aparelho respiratório e sobre a resistência ao fluxo aéreo. É um teste que auxilia na prevenção e permite o diagnóstico e a quantificação dos distúrbios ventilatórios, tendo

um importante papel na pneumologia ocupacional. Para a realização do teste espirométrico foi utilizada a técnica orientada pela *American Thoracic Society* que consiste numa expiração forçada até o limite do volume de reserva expiratória, após inspiração máxima¹⁰.

3.2.4 Coleta das Amostras de Sangue

Para a realização das análises de hemograma completo, da atividade da enzima GST e dos genótipos das enzimas GSTM1, GSTT1 e GSTP1 foram coletados, em tubos contendo anticoagulante EDTA, cerca de 10 mL de sangue através de punção venosa. Em seguida, os mesmos foram acondicionados sob refrigeração até o momento das análises.

3.3 Materiais

3.3.1 Reagentes

- Desoxiribonuclease (DNAase, RNAase free), *Invitrogen Life Technologies*;
- DNA Taq Polimerase Recombinante, *Invitrogen Life Technologies*;
- Enzima de restrição ALW261, *Fermentas Ltd.*;
- Desoxinucleosídeos 5'-trifosfato, *Invitrogen Life Technologies*;
- Oligos liofilizados (*primers*), *Invitrogen Life Technologies*;
- Proteinase K 20 mg/mL, *Invitrogen Life Technologies*;
- 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), *Acros*;
- Glutathione (GSH), *Sigma Aldrich*;

3.3.2 Equipamentos

- Espectrofotômetro UV–Visível 1601 A, *Shimadzu*;
- Termociclador PCR Mastercycler, *Eppendorf*;
- Aparelho de fotodocumentação, *DNR MiniBis Pro*;
- Centrífuga 5415R, *Eppendorf*;
- Centrífuga CT-600, *Cientec*;

3.4 Extração de DNA Genômico Humano

A extração de DNA genômico humano foi realizada através do método de Sambrook & Russel⁵³ modificado por Mitri³⁵, cujos procedimentos estão descritos a seguir:

Uma alíquota (500µL) de sangue total foi tratada com 1500µL de tampão de lise de eritrócito (Tris-HCl 20mM, pH 7,6) e centrifugadas por 30 segundos em velocidade máxima e à temperatura ambiente, com posterior remoção dos sobrenadantes. Este procedimento foi repetido. Após esta etapa, os *pellets* de leucócitos obtidos foram lavados com 600µL de tampão de lise celular (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1mM, pH 8,0; SDS 0,1%), homogeneizados e incubados, primeiramente, com 7µL de proteinase K por 2 horas a 56°C e, posteriormente, com 3µL de RNase por 40 minutos a 37°C. Após este procedimento, a mistura obtida foi tratada com 200µL de acetato de potássio e centrifugada a 4°C por 3 minutos em velocidade máxima. O sobrenadante foi lavado com 600µL de isopropanol e centrifugado em temperatura ambiente por 1 minuto em velocidade máxima. Depois, foi acrescentado 600µL de etanol 70%, centrifugado por 1 minuto à temperatura ambiente em velocidade máxima. O precipitado de DNA, após seco,

foi ressuspensão com 100µL de TE (Tris-HCl 10 mM, pH 7,6; EDTA 1 mM, pH 8,0) e guardado a -20°C.

Após a extração, a solução de DNA foi diluída 10 vezes com água destilada e quantificada através da absorvância no comprimento de onda de 260nm, utilizando espectrofotômetro. A concentração da solução foi determinada a partir da seguinte relação: 1,0 absorvância ⇒ 50 µg/mL de DNA.

3.5 Determinação do Polimorfismo da GSTP1

A metodologia de determinação do polimorfismo da GSTP1 foi realizada através de genotipagem. A amplificação do fragmento polimórfico da enzima através da técnica de *PCR-RFLP* (*Polymerase Chain Reaction-restriction Fragment Length Polymorphism*) gera um fragmento de 176 pb. Nesta técnica, cada amostra foi preparada com: 1µL de uma mistura contendo cada tipo de dNTP 200µM, 5µL de tampão Tris-HCl 10 mM, pH 9,0, 1,5µL de cloreto de magnésio 1,5 mM, 1µL de um *mix* dos *primers* (senso: 5'-ACCCAGGGCTCTATGGGAA-3' e anti-senso 5'-TGAGGGCACAAGAAGCCCCT-3') a 10µM, 2,5 unidades de Taq-DNA polimerase, 100ng de DNA como molde e água estéril e destilada para completar 50µL de volume final.

Posteriormente, as amostras foram colocadas no termociclador, cujas condições foram padronizadas em: 95°C por 5 minutos; 94°C por 30 segundos; 55°C por 30 segundos; 72°C por 30 segundos (as três últimas etapas foram repetidas 40 vezes) e 72°C por 10 minutos. Após a *PCR*, as amostras foram armazenadas a -20°C.

Após esta etapa, foi realizada uma eletroforese para análise do produto amplificado em gel de agarose 2% preparado com tampão TAE (Tris-acetato 40mM/EDTA 1mM, pH 8,0). As

condições da fonte para corrida foram selecionadas em 85 volts, 220mA, por 1:30h. Depois da eletroforese, o gel foi submetido à coloração com brometo de etídeo 0,5µg/mL (em tampão TAE).

3.5.1 Digestão com a enzima de restrição ALW261

O produto da PCR foi digerido com a enzima de restrição ALW261. A reação de digestão foi realizada para cada amostra, preparando-se soluções contendo 2 µL de tampão, 10 unidades da enzima ALW261, 10µL da mistura da reação de PCR (0,1 a 0,5µg de DNA) e 18µL de água estéril. As amostras foram incubadas *overnight* a 37°C, seguida de incubação por 5 minutos a 65°C para paralisação da reação.

A revelação do polimorfismo da enzima GSTP1 foi realizada por eletroforese em gel de agarose 3,5% preparado com tampão TAE. As condições da fonte foram: 60 volts, 220mA por 1:30h. Depois da eletroforese, o gel foi submetido à coloração com brometo de etídeo 0,5µg/mL (em tampão TAE). O quadro 1 mostra os tamanhos das bandas em relação aos possíveis genótipos da GSTP1.

Quadro 1: Tamanho das bandas referente aos diferentes genótipos da GSTP1.

Genótipos GSTP1	Tamanhos das bandas (pb)
A/A	176
A/G	176, 91 e 85
G/G	91 e 85

3.6 Determinação do Genótipo da GSTM1 e GSTT1

A determinação do genótipo da GSTM1 e GSTT1 foi feita através da amplificação dos fragmentos polimórficos das enzimas por meio da técnica de *PCR multiplex*, utilizando beta-globina como controle positivo. Cada amostra foi preparada com: 1 µL de uma mistura contendo cada tipo de dNTP 200µM, 5 µL de tampão Tris-HCl 10 mM, pH 9,0, 2 µL de cloreto de magnésio 1,5 mM, 1µL de um *mix* de cada par de *primers* (*senso e anti-senso*) GSTT1, GSTM1 e beta-globina a 10µM (quadro 2), 2,5 U de Taq-DNA polimerase, 100ng de DNA como molde e água estéril e destilada para completar 50µL de volume final. Após este procedimento, as amostras foram colocadas no termociclador, com as seguintes condições: 95°C por 3 minutos, 35 ciclos de: 94°C por 2 minutos, 61°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos e para finalizar, 72°C por 10 minutos. Os produtos amplificados foram armazenados a -20°C.

Os polimorfismos da GSTT1 e GSTM1 foram revelados por eletroforese em gel de agarose 2% preparado com tampão TAE. As condições da fonte foram: 85 volts, 220mA por 1:45h. Depois da eletroforese, o gel foi submetido à coloração com brometo de etídeo 0,5µg/mL (em tampão TAE).

Quadro 2: Sequências de *primers* e tamanho das bandas utilizadas na reação de PCR.

	Primer senso	Primer anti-senso	Tamanho das bandas (pb)
GSTM1	5'-TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC-3'	5'-TCACCGGATCATGGCCAGCA-3'	215
GSTT1	5'-GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC-3'	5'-GTTGGGCTCAAATATACGGTG-3'	480
B - globina	5'-CAACTTCATCCACGTTCCACC-3'	5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3'	268

3.7 Determinação da Atividade da GST

A determinação da atividade da GST foi realizada por espectrofotometria UV-Visível, no comprimento de onda de 340nm, utilizando 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno como substrato universal, de acordo com o método descrito por Habig *et al*⁵⁴.

Primeiramente, 2mL de sangue total foi centrifugado a 1200g por 30 minutos. Depois, uma alíquota (500µL) de eritrócitos (sedimento) foi transferida para um novo tubo de ensaio e, então, foi adicionado 5mL de NaCl (0,9%). Em seguida, cada tubo foi homogeneizado por 15 segundos e centrifugado a 1200g por 10 minutos. Após, o sobrenadante foi descartado e esse procedimento repetido mais duas vezes.

Posteriormente, duas alíquotas (50 µL) de eritrócitos foram transferidas para dois tubos de ensaio e, em cada tubo, foi adicionado 1450 µL de água estéril e destilada e, foram homogeneizados por 30 segundos.

No momento da leitura no espectrofotômetro, foram preparados: o branco com: 2,8 ml de tampão fosfato (PBS; 0,1M, pH=6,5), 0,1 mL de GSH (0,3M, preparada em PBS 0,1M) e 0,1 mL de CDNB (0,3M, preparada em etanol 95%) e a amostra com: 2,7 mL de PBS, 0,1 mL de GSH, 0,1mL de CDNB e 0,1 mL de hemolizado. A leitura das amostras foi realizada em modo cinético, a 340 nm, durante 1 minuto.

Para a determinação da atividade da GST foi utilizado o seguinte cálculo:

$$\text{Unidade/mL} = [\Delta\text{Abs}/\text{min Amostra} - \Delta\text{Abs}/\text{min Branco} \times (3,0)(\text{FD})]/[(9,6)\times(0,1)]$$

Onde:

Fator de extinção molar = 9,6

Volume do hemolisado utilizado = 0,1 mL

Volume final na cubeta = 3,0 mL

FD = fator de diluição

3.8 Estatística

Para todas as análises foi utilizado o programa estatístico SPSS 13. A análise estatística realizada nas comparações entre dois grupos foi o Teste t-Student e Teste de Fisher. E a análise multivariada (ANOVA) foi utilizada para comparar médias de variáveis contínuas com distribuição normal ou com n significativo.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão abordados os resultados encontrados na população estudada que foi composta de um total de 82 indivíduos sendo todos de idade superior a 18 anos e do sexo masculino, sendo formada por trabalhadores que possuem um histórico de exposição à sílica. Em nem todos os dados avaliados, foi obtida as informações necessárias de todos os trabalhadores.

4.1 Características da População

A maioria destes trabalhadores relatou trabalhar ou ter trabalhado na indústria naval, principalmente nos setores de pintura e jateamento de areia, que representam atividades laborais com significativa exposição à sílica. A má qualidade do ar, devido á ausência de sistemas de ventilação e exaustão durante a reforma ou montagem de navios e plataformas, juntamente com o uso inadequado de medidas de proteção individual e/ou coletiva contribuem para a acentuação do risco para o desenvolvimento da silicose⁵⁵. O grupo estudado foi composto de 33,3% de trabalhadores que ainda estão ativos e 66,7 % aposentados. Quanto à duração da exposição, a variação foi de 10 meses a 44 anos, com média de 19,3 anos. Na tabela 3 são apresentados os resultados das análises descritivas das características sócio-demográficas da população estudada.

Em relação à idade, a faixa etária de maior freqüência foi a de 50-59 anos e a de menor freqüência foi a abaixo de 39 anos e a acima de 60 anos, sendo todos os indivíduos do sexo masculino. A presença de homens nestas atividades é predominante, o que é compatível com as características das principais profissões que envolvem a exposição à sílica, excetuando-se os casos de pequenos artesões, como no ramo da lapidação e indústria têxtil, no qual a mão-de-obra feminina é incorporada⁵⁶.

A maioria dos trabalhadores apresenta baixo nível de escolaridade onde 42,9% tinham ensino fundamental incompleto. Em um estudo realizado nos Estados Unidos foi observado que a

baixa escolaridade, inferior a quatro anos, expunha os trabalhadores a um risco cinco vezes maior do que a alta escolaridade, superior a onze anos quando comparados com controles de trabalho⁵⁷.

Quanto ao estilo de vida, foi encontrado que 49,1% consomem bebida alcoólica, enquanto que 50,9% não bebem. E 16,9% declararam ser tabagistas, 37,7% se declararam não tabagistas e 45,5% ex-tabagistas. Assim sendo, 83,1% dos indivíduos já tiveram o hábito de fumar e 16,9% nunca tiveram este hábito. Um estudo com trabalhadores brasileiros expostos à sílica no qual foi detectado que 64% (n=192) já tinham fumado. E um outro estudo, sobre o fumo como fator de risco nos portadores de silicose, foi encontrado que 66,7% (n=20) eram fumantes^{56,58}.

Com relação ao tabagismo e a silicose não foi possível observar uma associação significativa entre eles. Contudo, em um estudo de meta-análise, feito a partir de relatórios epidemiológicos de seis estudos de coorte e dois estudos de caso-controle, foi encontrado que indivíduos silicóticos fumantes têm um risco estimado de 4,47 de desenvolver câncer de pulmão e silicóticos não-fumantes têm um risco de 2,24 de desenvolver a doença quando comparados com indivíduos saudáveis não fumantes. Portanto, os pacientes com silicose devem ser, fortemente, aconselhados a não fumar a fim, de prevenir o câncer de pulmão⁵⁹.

Tabela 3: Características sócio-demográficas da população estudada.

Variáveis	n
Número (n)	82
Sexo	
Masculino	82 (100%)
Feminino	0 (0%)
Idade (média/anos) (dp) ¹	50,3 (±7,7)
Média de exposição (média/anos) (dp) ¹	19,3 (± 8,1)
Ativo/ Inativo	
Ativo	27 (33,3%)
Inativo	54 (66,7%)
Escolaridade	
Fundamental incompleto	24(42,9%)
Fundamental completo	13(23,2%)
Ensino médio incompleto	11 (19,6%)
Ensino médio completo	7 (12,5%)
Mais que o ensino médio	1 (1,8%)
Tabagismo	
Fumantes	13 (16,9%)
Ex-fumantes	35 (45,5%)
Não fumantes	29 (37,7%)
Consumo de bebida alcoólica	
Consome:	28 (49,1%)
Não consome	29 (50,9%)

(1) Média= média aritmética; DP= desvio padrão

4.2 Avaliação clínica da população

A distribuição dos indivíduos nas categorias radiológicas ocorreu da seguinte maneira 8: raio-x normal – 48 (60,8%); categoria 1 – 12 (15,2%); categoria 2 – 13 (16,5%); categoria 3 – 6 (7,6%), não tendo sido possível diagnosticar 3 indivíduos (Figura 7). Com isso, houve o diagnóstico de 31 casos de silicose.

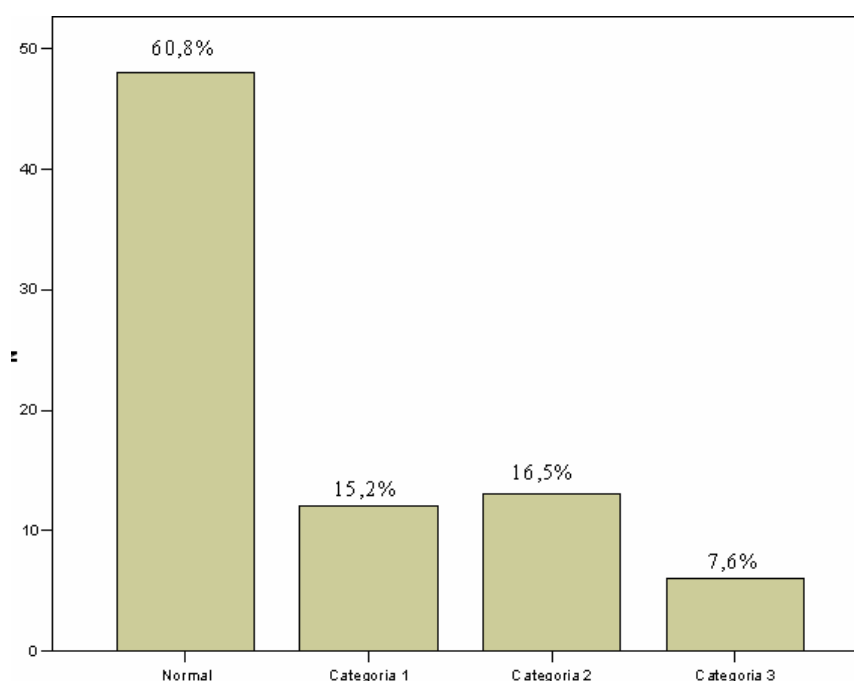


Figura 7: Distribuição dos trabalhadores expostos à sílica segundo as categorias radiológicas da doença.

Quanto aos parâmetros de função respiratória, conforme mostrado, na figura 8, 18 indivíduos obtiveram resultados normais, 12 tiveram distúrbios muito leves, 30 distúrbios leves, 10 distúrbios moderados e 7 tiveram distúrbios acentuados, 5 indivíduos não realizaram o exame. O exame espirométrico é recomendado para a avaliação pulmonar dos indivíduos portadores da silicose, porém não existem padrões de disfunção típicos nesta doença e a detecção de alterações

funcionais precoces é tecnicamente muito difícil, pois a doença se inicia nas vias aéreas distais⁶⁰. Neste estudo, foi encontrada diferença significativa através do Teste de *Fisher* entre o diagnóstico das categorias de silicose e os parâmetros de função respiratória ($p= 0,033$) demonstrando que estes padrões estão relacionados com os piores índices que foram obtidos nas categorias mais avançadas. Carneiro *et al*⁵⁶, em seu estudo, também encontraram os mesmos achados.

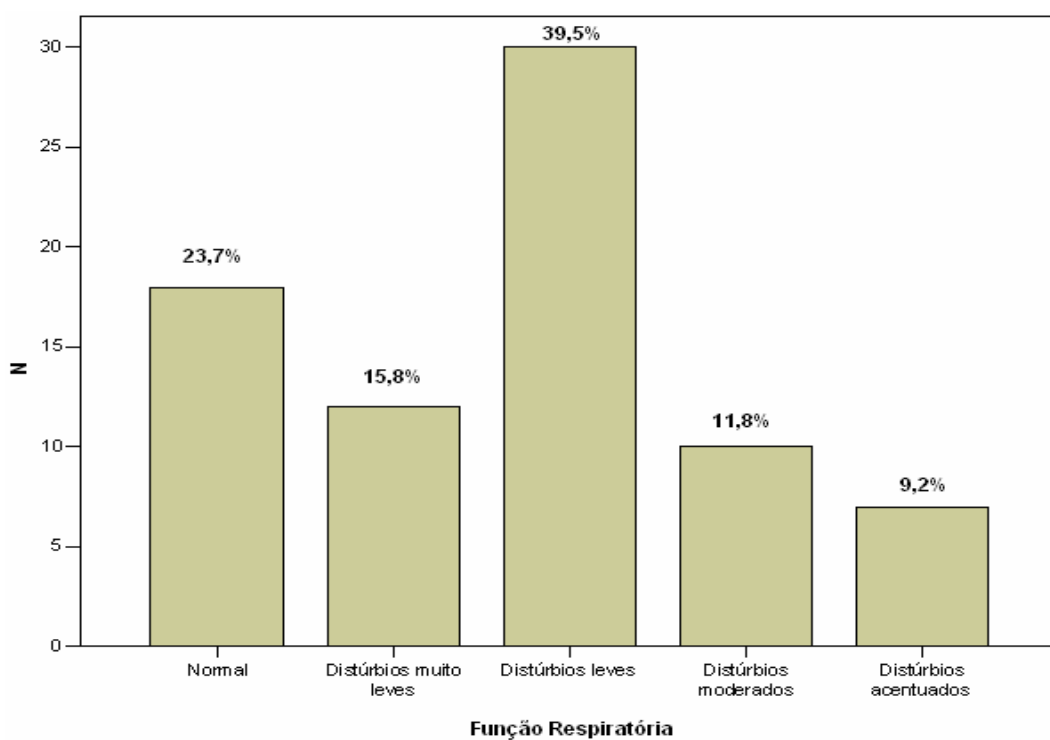


Figura 8: Distribuição dos distúrbios respiratórios avaliados por espirometria no grupo exposto à sílica.

A tuberculose ocorreu em 16 indivíduos (20,3%). Comparando-se silicóticos com não silicóticos foi encontrado que a ocorrência de tuberculose foi cerca de 3,97 vezes (95% IC 1,40;11,24, $p=0,009$) maior nos que tinham silicose. Estes dados são similares aos encontrados

em um estudo realizado com mineiros de ouro da África do Sul, onde o risco relativo de ter tuberculose foi de 2,8 (95% IC 1,9; 4,1) vezes maior quando comparados silicóticos com não silicóticos⁶¹. Segundo Filho & Santos³, a tuberculose pulmonar é maior em indivíduos com história presente ou passada de exposição à sílica com ou sem silicose e que o tempo de exposição e a carga de sílica inalada influenciam no aumento do risco de contrair tuberculose. Tendo em foco a exposição e/ou a doença é necessário que ações profiláticas sejam empregadas especialmente para populações expostas à sílica, pois esta tem uma maior deterioração da função pulmonar.

4.3 Determinação do nível da enzima GST

A tabela 4 apresenta os resultados do nível da atividade da enzima GST na população de trabalhadores expostos à sílica, subdivididos em doentes e não-doentes. A média do nível da GST mostrou-se mais alta em indivíduos expostos não-doente (1,74 unid/mL de enzima) do que em exposto doentes (1,61 unid/mL de enzima), não sendo esta diferença significativa ($p= 0,401$), não foi realizada a análise em 16 trabalhadores.

Tabela 4: Nível da atividade da enzima GST na população de trabalhadores expostos à sílica.

	Exposto não doente			Exposto doente			<i>p</i>
	N	Média	SD	N	Média	SD	
GST (Unid/mL enzima)	35	1,74	0,62	31	1,61	0,66	0,401

A tabela 5 mostra os resultados obtidos quando comparado o nível da atividade da enzima GST com as diferentes categorias da doença. Foi encontrada diferença significativa quando comparada a categoria normal com a categoria 1 ($p= 0,031$) e a categoria 1 com a categoria 3 ($p= 0,047$), não foi realizada a análise em 18 trabalhadores.

Tabela 5: Nível da enzima GST nas diferentes categorias da silicose na população de trabalhadores expostos à sílica.

	Categoria Normal			Categoria 1			Categoria 2			Categoria 3		
	N	Média	SD	N	Média	SD	N	Média	SD	N	Média	SD
GST (Unid/mL enzima)	37	1,79	0,65	11	1,20	0,46	10	1,59	0,62	06	2,02	0,42

Evelo *et al*⁶² realizaram um estudo, com amostras de sangue de mineiros expostos a pó de carvão, para examinar as mudanças do nível da atividade da GST em detrimento do desenvolvimento de pneumoconioses. Como resultado foi obtido que a atividade da enzima encontrava-se diminuída em indivíduos com fibrose pulmonar em estágio inicial (0/1 – 1/2) quando comparados com o grupo controle. No estágio mais avançado da doença (> 2/1), não foi encontrada diferença significativa com o controle. Os autores relatam que a diminuição na concentração da atividade da GST é, possivelmente, causada pelo excesso de liberação de EROS pelos macrófagos alveolares e os neutrófilos no tecido pulmonar.

Joca⁶³ comparou o mesmo grupo de trabalhadores expostos à sílica deste estudo com um grupo não exposto. A média da atividade da GST foi de 2,35 unid/mL de enzima no grupo não exposto, sendo constatado que no início do processo da doença existe uma inicial depleção dos

níveis de antioxidantes (GST) e, depois, no decorrer do desenvolvimento da silicose, ocorre uma recuperação destes níveis ficando próximo dos níveis normais.

4.4 Determinação do polimorfismo da enzima GSTP1

Para a genotipagem da enzima GSTP1 foi realizado um PCR-RFLP em um total de 76 amostras. Todas amplificaram de forma esperada, com a presença de banda única de tamanho correspondente a 176pb e ausência de bandas inespecíficas. Depois da amplificação, foi realizada a digestão enzimática do fragmento polimórfico, sendo o tamanho correspondente ao genótipo A/A de 176pb, para A/G de 85pb, 91pb e 176pb e para G/G de 85pb e 91pb como mostrados nas figuras 9 e 10.

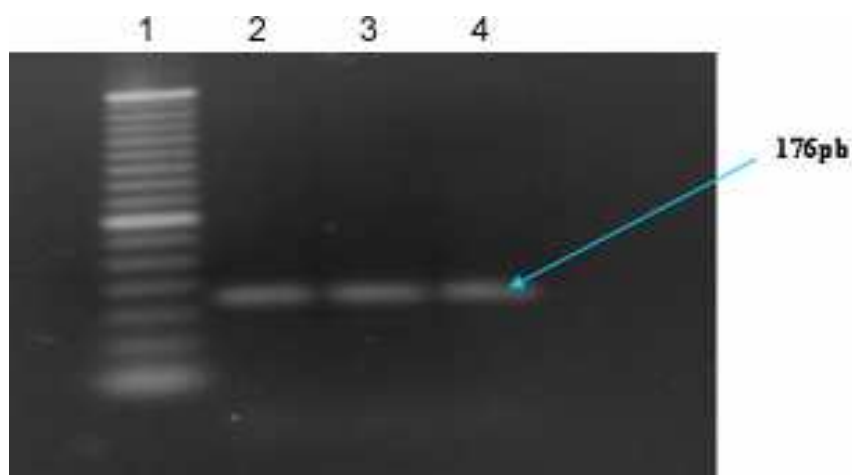


Figura 9: Eletroforese em gel de agarose 2%: PCR GSTP1. 1^a raia: padrão molecular de tamanho de 50pb; 2^a, 3^a e 4^a: bandas de 176pb referente ao fragmento polimórfico da GSTP1.

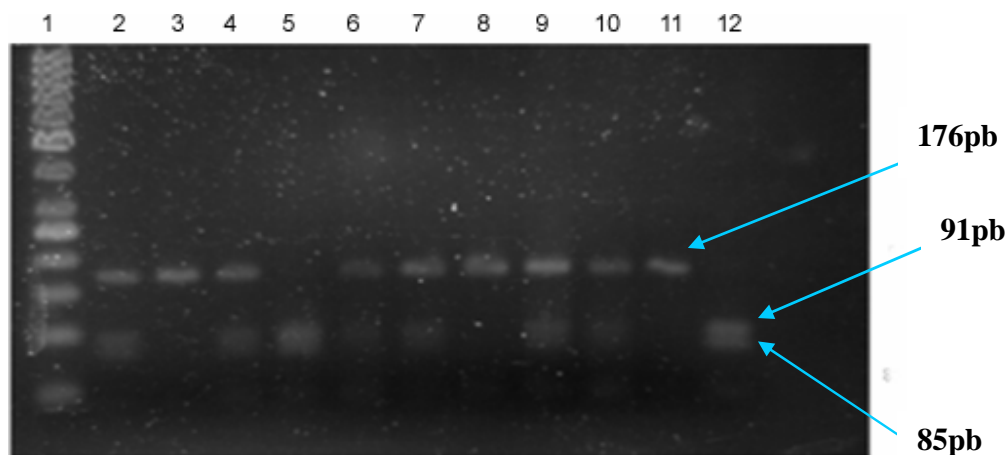


Figura 10: Eletroforese em gel de agarose 3.5%: Genotipagem GSTP1. 1ª raia: padrão de tamanho de 50pb; 3ª, 8ª e 11ª: genótipo A/A; 2ª, 4ª, 6ª, 7ª, 9ª, 10ª: genótipo A/G; 5ª e 12ª: genótipo G/G. A/A 176pb; A/G: 176pb, 91pb e 85pb; G/G: 91pb e 85pb.

Foram observadas frequências de 31,6% (n=24) para homozigotos A/A, 57,9% (n=44) para heterozigotos A/G e 10,5% (n=8) de homozigotos G/G. A frequência encontrada para o alelo A foi de 0,605 e de 0,395 para o alelo G. A análise estatística das frequências observadas e esperadas para cada genótipo não diferiram pelo teste de χ^2 ao nível de significância de 5%, mostrando que estes alelos estão bem distribuídos na população e em equilíbrio de Hardy-Weinberg. A tabela 8 apresenta a frequência genotípica desses alelos em estudos de diferentes autores.

Em um estudo brasileiro, a frequência encontrada do polimorfismo da enzima GSTP1 foi de 49,7% para os indivíduos com genótipo A/A, 38,1% para os com genótipo A/G e 12,2% para o genótipo G/G, com frequência alélica A de 0,687 sendo para o G 0,313. E também foi observado que o genótipo G/G foi mais frequente em indivíduos brancos do que em não brancos⁴⁹.

Já um outro estudo com indivíduos afro descendentes, residentes do Rio Grande do Sul, a distribuição genotípica encontrada foi de 29% para A/A, 58% para A/G e 13% para G/G⁴².

Watson *et al*⁶⁴ realizou um estudo com uma população norte americana, onde as frequências achadas para a população euro-americana foram de 42% para o genótipo A/A, 51% para A/G e 7% G/G. E para a população afro-americana foi de 35%, 46% e 19%, respectivamente. A Tabela 6 apresenta vários estudos de frequência genotípica, a partir da descendência, mostrando que a frequência da GSTP1 apresenta grande variação.

Tabela 6: Frequência genotípica da GSTP1 em relação à descendência (Adaptado de Mo *et al*⁶⁵).

Estudos	Nacionalidade	Descendência	GSTP1 (%)		
			A/A	A/G	G/G
Harries <i>et al</i>	Reino Unido	Caucasiano	51,0	42,6	6,5
Wadelius <i>et al</i>	Suécia e Dinamarca	Caucasiano	43,9	40,9	15,2
Autrup <i>et al</i>	Dinamarca	Caucasiano	42,0	58,0	0,0
Steinhoff <i>et al</i>	Alemanha	Caucasiano	55,1	36,2	8,7
Shepard <i>et al</i>	América do Norte	Caucasiano	45,4	44,1	10,5
Gsur <i>et al</i>	Áustria	Caucasiano	39,2	46,4	14,4
Kote-Jarai <i>et al</i>	Reino Unido	Caucasiano	51,3	38,5	10,3
Luscombe <i>et al</i>	Reino Unido	Caucasiano	42,9	44,8	12,3
Beer <i>et al</i>	América do Norte	Caucasiano	43,2	47,3	9,5
Jeronimo <i>et al</i>	Portugal	Caucasiano	43,3	47,5	9,2
Kidd <i>et al</i>	América do Norte	Caucasiano	56,6	43,4	0,0
Nam <i>et al</i>	Canadá	Caucasiano	52,2	42,3	5,5
Mao <i>et al</i>	América do Norte	Caucasiano	51,9	41,5	6,6
Debes <i>et al</i>	América do Norte	Caucasiano	38,2	49,0	12,8
Antognelli <i>et al</i>	Itália	Caucasiano	61,1	33,3	5,6
Sinvastava <i>et al</i>	Índia	Caucasiano	57,6	38,9	3,5
Vijayalakshmi <i>et al</i>	Índia	Caucasiano	42,0	52,0	6,0
Agalliu <i>et al</i>	América do Norte	Caucasiano	43,2	45,7	11,1
Mittal <i>et al</i>	Índia	Caucasiano	55,2	40,0	4,8
Rybicki <i>et al</i>	América do Norte	Caucasiano	37,9	50,0	12,1
Nakazato <i>et al</i>	Japão	Asiático	72,4	27,6	0,0
Komiya <i>et al</i>	Japão	Asiático	72,9	23,7	3,4
Agalliu <i>et al</i>	América do Norte	Africano-Americano	6,7	80,0	13,3
Rybicki <i>et al</i>	América do Norte	Africano-Americano	27,9	56,7	15,4

Foi observado que as médias da atividade enzimática da GST foram menores (1,58 U/mL enzima) nos indivíduos com alelo G em comparação com os indivíduos com alelo A (1,84 U/mL enzima), como mostrado na figura 11. Contudo, a diferença não foi estatisticamente significativa ($p=0,122$). Este achado é similar a estudos que sugerem que o polimorfismo genético da GSTP1 (alelo G) pode resultar na redução da atividade enzimática da GST^{64,66}.

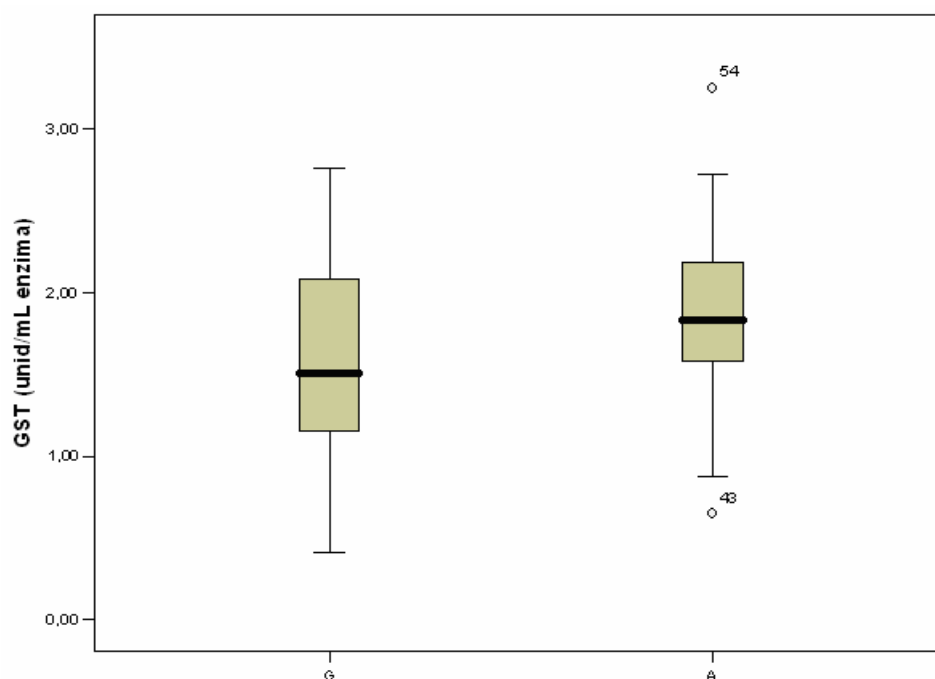


Figura 11: Comparação das médias de atividade da GST com os indivíduos com alelo A e G.

Como mostrado na tabela 7, quando comparado o grupo dos trabalhadores de genótipo A/A com o de genótipo G/G, foi encontrado que o risco de desenvolver a silicose é 2,00 vezes maior nos que possuem o G/G. Quando comparado o grupo portador do genótipo A/A com o grupo A/G, foi achado que os indivíduos de genótipo A/G têm 1,91 vezes mais chances de

desenvolver a doença. E, quando comparado o grupo dos trabalhadores de genótipo A/A com o grupo de genótipos A/G ou G/G, foi encontrado que os de genótipo A/G e G/G têm o risco aumentado em 1,92 vezes de desenvolver a silicose. Embora nenhuma das análises tenha sido significativa, provavelmente, por conta do tamanho da amostra, os resultados sugerem que ter o alelo G pode conferir uma maior susceptibilidade de desenvolver a doença. Os dados encontrados são similares a de um estudo realizado com mineiros búlgaros, onde obtiveram que o alelo G era mais comum no grupo de trabalhadores com silicose do que no grupo controle, sugerindo que o alelo pode estar envolvido na predisposição genética de desenvolver a silicose³⁶.

Tabela 7: Análise do risco de desenvolver silicose em relação aos genótipos da GSTP1.

Polimorfismo	N		ODDS (95%IC)
	Exposto não doente	Exposto doente	
A/A	16	08	2,00 (0,394;10,158)
G/G	04	04	
A/A	16	08	1,91 (0,676; 5,391)
A/G	22	21	
A/A	16	08	1,92 (0,700; 5,284)
A/G e G/G	26	25	

Com relação ao hábito de fumar, dentre os trabalhadores que assumiram já ter fumado, 4 indivíduos são doentes silicóticos, sendo que 3 destes possuem o alelo G para a enzima GSTP1. Kim *et al*⁶⁷ sugerem que a combinação dos polimorfismos da GSTM1 e GSTP1 podem modificar o efeito do fumaça de cigarro nos níveis (aumentando) do fator de necrose tumoral no soro, indicando, assim, uma susceptibilidade genética para doenças relacionadas ao tabagismo.

4.5 Determinação dos polimorfismos das enzimas GSTM1 e GSTT1

Para a genotipagem da GSTM1 e GSTT1, foram analisadas 76 amostras que foram amplificadas através de PCR *multiplex*. Conforme indicado na figura 12, os tamanhos das bandas referentes aos fragmentos polimórficos foram de 480pb para o genótipo GSTT1 positivo e de 215pb para GSTM1 positivo.

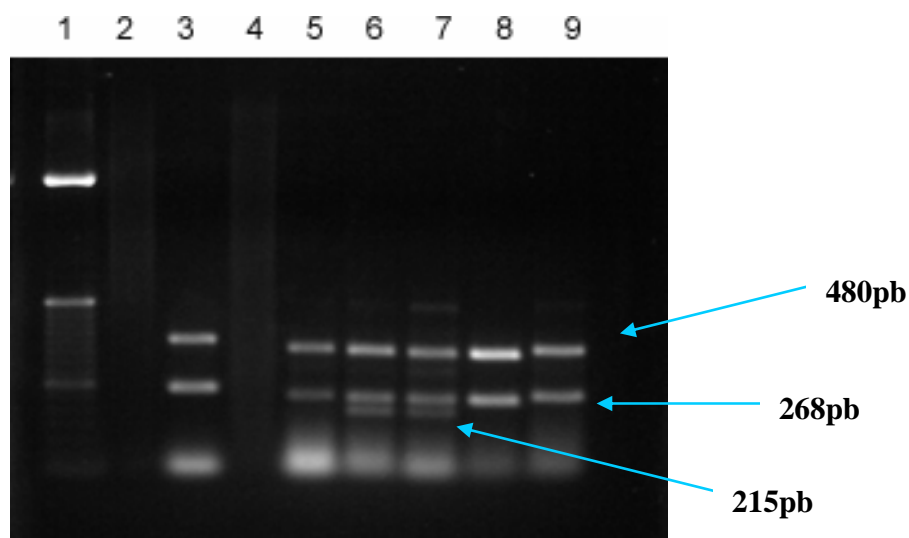


Figura 12: Eletroforese em gel de agarose 2%: genotipagem GSTM1 e GSTT1. 1^a raia: padrão de tamanho molecular de 50pb; 6^a, 7^a: genótipo GSTM1 positivo; 3^a, 5^a, 8^a, 9^a: GSTM1 negativo; 3^a, 5^a, 6^a, 7^a, 8^a, 9^a: genótipo GSTT1 positivo e nenhum indivíduo: GSTT1 negativo. GSTM1: 215pb; GSTT1: 480pb; Beta-globina: 268pb.

Para os genes GSTM1 e GSTT1 foram observadas as frequências de 64,5% (n=49) para o genótipo positivo e 35,5% (n=27) para o genótipo nulo. Segundo a literatura, o percentual de indivíduos que não expressam a GSTM1 é mais alto em caucasianos e asiáticos (50%) do que em afro-americanos (27%). Rossini *et al*⁴⁹ analisaram a frequência na população brasileira e verificaram que 42,1% tinham o genótipo nulo para a GSTM1, sendo o resultado similar aos

estudos de Arruda *et al*⁶⁸ e Hatagima *et al*⁶⁹. Neste caso, a frequência parece ser alta em indivíduos com genótipo nulo, fato também observado neste estudo.

Estima-se que de 10 a 60% dos indivíduos não expressam a enzima GSTT1, sendo aproximadamente, 60% dos asiáticos, 40% dos africanos e 20% dos caucasianos. Em um estudo realizado com uma população brasileira foi encontrado que 25,4% tinham o genótipo nulo. Este resultado é considerado alto e similar quando comparado com as frequências de populações de países ocidentais, porém, baixo, se confrontado com as frequências de países asiáticos^{39,49}. Os resultados do estudo acima aproximam-se da frequência encontrada para indivíduos africanos.

Foi observado uma diminuição na média da atividade enzimática da GST nos indivíduos com o genótipo GSTM1 nulo (1,62 unid/mL, $p= 0,490$) em comparação aos com genótipo positivo (1,73 unid/mL) (figura 13a). E também foi encontrado que os trabalhadores com o genótipo GSTT1 nulo (1,54 unid/mL, $p= 0,145$) tinham uma menor média da atividade da enzima em relação aos com genótipo positivo (1,78 unid/mL) (figura 13b). E na tabela 8, são mostradas as médias do nível da atividade da GST quando comparados os genótipos GSTM1 e GSTT1. Sendo, observado que a menor média de GST (1,36 unid/mL) foi encontrada nos indivíduos com ambos os genótipos nulos. E também foi encontrado que dentre os trabalhadores GSTT1 nulo há uma diferença significativa entre os que são GSTM1 nulo e GSTM1 positivo ($p= 0,07$). Como reportado por Paiva *et al*⁷⁰, a deleção dos genes da GSTM1 e/ou GSTT1 resulta(m) na completa perda da atividade desta(s) enzima(s), diminuindo assim, o nível da atividade da GST, o que dificulta o processo de detoxificação.

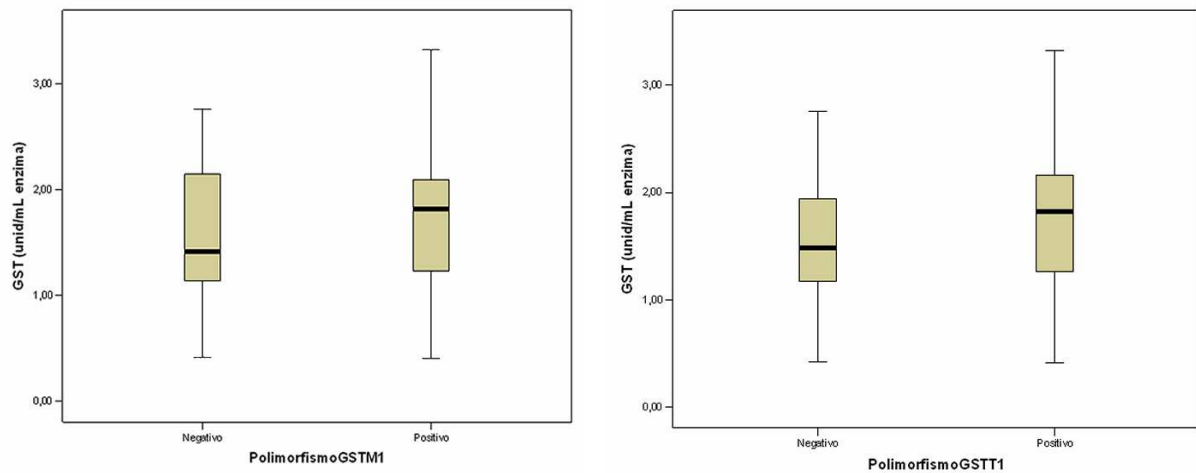


Figura 13: a) Comportamento da atividade da enzima GST em função do genótipo da GSTM1.
 b) Comportamento da atividade da enzima GST em função do genótipo da GSTT1.

Tabela 8: Relação entre os genótipos GSTM1 e GSTT1 com a atividade da GST.

	GSTT1 nulo (n)	GSTT1 positivo (n)
GSTM1 nulo	1,36 (11)	1,71 (12)
GSTM1 positivo	1,84 (13)	1,75 (26)
P	0,07	0,84

4.6 Relação entre os genótipos da GSTM1, GSTP1 e GSTT1

Como mostrado na tabela 9, ao analisar o grupo dos trabalhadores com genótipo GSTT1 nulo, observou-se que os indivíduos portadores do alelo GSTP1 G tinham menor nível da atividade da GST ($p= 0,641$) quando comparado com os que têm alelo GSTP1 A, não significativa, provavelmente, por causa do tamanho da amostra. E ao analisar o grupo dos portadores do genótipo GSTT1 positivo, também foi observado que os que possuem o alelo GSTP1 G, tinham menor atividade enzimática da GST quando comparados com os de alelo

GSTP1 A ($p=0,048$). Os resultados encontrados indicam que, independente, do genótipo da GSTT1, os portadores do alelo GSTP1 G têm uma diminuição da atividade da GST.

Tabela 9: Relação dos genótipos da GSTT1 com os alelos da GSTP1.

Polimorfismos	GSTP1 A (n)	GSTP1 G (n)	<i>p</i>
GSTT1 positivo	2,01 (13)	1,60 (25)	0,048
GSTT1 nulo	1,64 (5)	1,52 (17)	0,641

Conforme indicado na tabela 10, o grupo dos indivíduos GSTM1 nulo e com alelo GSTP1 G apresentaram uma diminuição no nível da atividade da GST em relação aos com alelo GSTP1 A ($p=0,022$). E o grupo de trabalhadores com o genótipo GSTM1 positivo e GSTP1 G, também, teve menor atividade enzimática da GST quando comparado com os com alelo GSTP1 A ($p=0,589$), não significativa, possivelmente, por conta do número amostral. Os dados obtidos também sugerem que, independente, do genótipo da GSTM1, os indivíduos que possuem o alelo GSTP1 G têm um menor nível da atividade da GST. Sendo os achados similares ao estudo de Korytina *et al*⁷¹ que mostraram que somente a deleção do gene da GSTM1 não levaria ao agravamento de doenças ligadas ao sistema respiratório, mas em combinação com o alelo GSTP1 G isso poderia ocorrer. Possivelmente, isto deve estar relacionado ao fato de que dentre todos os tipos de GSTs, a GSTP1 está, principalmente, expressa nos alvéolos, macrófagos alveolares e bronquíolos.

Tabela 10: Relação dos genótipos da GSTM1 com os genótipos da GSTP1.

Polimorfismos	GSTP1 A (n)	GSTP1 G (n)	P
GSTM1 positivo	1,78 (11)	1,65 (26)	0,589
GSTM1 nulo	2,10 (7)	1,43 (16)	0,022

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo mostrou que os indivíduos com o alelo GSTP1G, independentemente do genótipo das enzimas GSTM1 e GSTT1, apresentaram uma maior susceptibilidade ao desenvolvimento da silicose.

Os fatores genéticos que conferem uma susceptibilidade diferenciada a indivíduos expostos a níveis semelhantes de determinada substância nociva devem ser considerados e avaliados em conjunto com outros parâmetros, afim de, diagnosticar precocemente o desenvolvimento da doença. Este estudo é uma etapa inicial que objetiva fornecer o polimorfismo da GSTP1 como uma ferramenta complementar na investigação da susceptibilidade a silicose.

6. CONCLUSÕES

- A atividade enzimática da GST comportou-se de acordo com a literatura, onde indivíduos silicóticos no estágio inicial da doença apresentam níveis menores da enzima;
- As frequências alélicas e genótípicas do gene GSTP1 encontradas neste estudo mostraram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg;
- De forma semelhante aos estudos reportados pela literatura, os trabalhadores expostos à sílica portadores do alelo G mostraram um risco maior de desenvolver silicose e atividade da GST menor;
- As frequências genótípicas das enzimas GSTM1 e GSTT1 foram similares aos valores encontrados na literatura;
- Os indivíduos com ambos os genótipos nulos para GSTM1 e GSTT1 quando comparados entre eles apresentaram menor atividade da enzima GST;
- Os trabalhadores portadores do alelo GSTP1 G têm menores níveis da atividade da GST, independente do genótipo das enzimas GSTM1 e GSTT1;
- Mais estudos de determinação do polimorfismo da GSTP1 devem ser conduzidos em populações expostas à sílica comparando com populações não expostas, pois os resultados encontrados na presente dissertação sugerem a utilização da determinação do polimorfismo da GSTP1 nos processos de avaliação da exposição à sílica, como uma ferramenta complementar na identificação de subgrupos mais susceptíveis ao desenvolvimento da doença silicose.

7. ANEXO

7.1 Anexo 1: questionário de avaliação de exposição a substâncias químicas

1- Número: _____

2-CESTEH número: _____

A) DADOS GERAIS

1. Data de hoje: ___/___/___

Hora do início: _____

2. Nome do voluntário

3. Endereço:

4. CEP: _____ -9-Faltando

5. Telefone de contato: _____ -9-Faltando

6. Sexo : 1 - M 2 - F

7. Estado Civil :

1-Casado 2-Solteiro 3-União Livre 4-Separado 5-Viúvo

8. Data de nascimento: ___/___/___

9. Idade: _____ anos

10. Você sabe ler e escrever? 1-sim 2-não (ir para pergunta 12) 9-Faltando

11. Até que ano você estudou na escola?

1-ensino fundamental completo 2-ensino fundamental incompleto

3-ensino médio completo 4-ensino médio incompleto

5-mais que o ensino médio. Cite: _____

9-Faltando

12. Quantas pessoas moram permanentemente em sua residência?

1-uma 2-duas 3-três 4-quatro 5-mais de quatro

13. Quantos cômodos (quartos e salas) têm a sua casa ?

1-um 2-dois 3-três 4-quatro 5-mais de quatro

14. Há quanto tempo você mora nesta casa? _____ anos e _____ meses 9-Faltando

15. Como é o piso da sua casa?

1- “vermelhão” 2- cimento 3- madeira (taco)
4- cerâmica 5- outros. Especifique: _____ 9- Faltando

16. Quando sua casa foi pintada pela última vez ? ____ anos ____ meses

1- nunca foi pintada (ir para pergunta 20) 9- Faltando

17. Na ocasião da pintura foi usada lixa para o preparo das paredes?

1- sim 2- não 9- Faltando

18. A sua casa possui água encanada?

1- sim 2- não (pular para a pergunta 20) 9- Faltando

19. Os encanamentos da sua casa são de:

1- plástico 2- metal 3- outros. Especifique: _____ 9- Faltando

20. Qual o destino do lixo da sua casa?

1- recolhido pelo lixeiro 2- colocado na caçamba 3- enterrado 4- queimado
5- deixado a céu aberto 6- outros. Especifique: _____ 9- Faltando

21. Existe próximo a sua residência:

1- Indústria de produtos de borracha

2- Indústria de plásticos

3- Indústria de cerâmica

4- Gráfica

5- Fábrica de tintas

6- Construção ou renovação de casas

7- Jateamento de areia

8- Atividade de derreter metais

9- Concerto de radiadores

10- Soldagem

11- Fábrica de bateria ou recarregadores

12- Incineração de Lixo

13- Atividade de contato com gasolina

14- Pintura de carros e eletrodomésticos

15- Refinaria

16- Lavoura (horta/pomar)

17- Outros. Especifique: _____

18- Não existe nenhuma atividade acima descrita

22. Você morou em algum lugar que fosse próximo a:

- 1- Indústria de produtos de borracha
- 2- Indústria de plásticos
- 3- Indústria de cerâmica
- 4- Gráfica
- 5- Fábrica de tintas
- 6- Construção ou renovação de casas
- 7- Jateamento de areia
- 8- Atividade de derreter metais
- 9- Concerto de radiadores
- 10- Soldagem
- 11- Fábrica de bateria ou recarregadores
- 12- Incineração de Lixo
- 13- Atividade de contato com gasolina
- 14- Pintura de carros e eletrodomésticos
- 15- Refinaria
- 16- Lavoura (horta/pomar)
- 17- Outros. Especifique: _____
- 18- Não existe nenhuma atividade acima descrita

23. A quanto tempo você mudou deste lugar? ____ anos e ____ meses 9-Faltando

24. Seu uniforme é lavado em casa? 1- sim 2- não

B) DADOS SOBRE O TRABALHO

25. Qual é o seu cargo no trabalho?

26. Como é a sua atividade de trabalho? Descreva todo o processo.

27. Há quanto tempo trabalha neste cargo? ____ anos ____ meses 9- Faltando

28. Qual é a sua carga horária semanal de trabalho? ____ hs/semana. 9- Faltando

29. Você usa equipamentos de proteção individual?

1- sim 2- não (ir para pergunta 38) 9- Faltando

30. Quais?

1- Luvas

2- Máscara

3- Protetor auricular

4- Óculos

5- Avental

6- Bota

7- Capacete

8- Outros. Especifique: _____

31. Com que frequência você usa luvas?

1- sempre 2- frequentemente 3- raramente

32. Com que frequência você usa máscara?

1- sempre 2- frequentemente 3- raramente

33. Com que frequência você usa protetor auricular?

1- sempre 2- frequentemente 3- raramente

34. Com que frequência você usa óculos?

1- sempre 2- frequentemente 3- raramente

35. Com que frequência você usa avental?

1- sempre 2- frequentemente 3- raramente

36. Com que frequência você usa bota?

1- sempre 2- frequentemente 3- raramente

37. Com que frequência você usa capacete?

1- sempre 2- frequentemente 3- raramente

38. Você fez exame médico admissional?

1- sim 2- não

39. Você faz exames médicos periódicos?

1- sim 2- não

40. Com qual frequência você faz exames periódicos?

1- semestral 2- anual 3- maior periodicidade _____

41. Você já foi afastado por motivo de doença?

1- sim 2- não

42. Qual doença? _____

43. Você já trabalhou em:

1- Indústria de produtos de borracha

2- Indústria de plásticos

- 3- Indústria de cerâmica
- 4- Gráfica
- 5- Fábrica de tintas
- 6- Construção ou renovação de casas
- 7- Jateamento de areia
- 8- Atividade de derreter metais
- 9- Concerto de radiadores
- 10- Soldagem
- 11- Fábrica de bateria ou recarregadores
- 12- Incineração de Lixo
- 13- Atividade de contato com gasolina
- 14- Pintura de carros e eletrodomésticos
- 15- Refinaria
- 16- Lavoura (horta/pomar)
- 17- Outros. Especifique: _____
- 18- Não existe nenhuma atividade acima descrita

44. Você já trabalhou em outro estaleiro?

- 1- sim 2- não (ir para pergunta 43)

45. Qual era o cargo que você exercia? _____

C) HÁBITOS

46. Você fuma?

- 1- sim. 2- não (ir para pergunta 49) 9- Faltando

47. Quantos cigarros você fuma por dia? ____ cigarros/dia _____ maços

- 9- Faltando

48. Há quanto tempo você fuma? ____ anos completos

- 9- Faltando (ir para pergunta 39)

49. Você já fumou?

- 1- sim 2- não (ir para pergunta 51) 9- Faltando

50. Você parou de fumar há quanto tempo? _____ anos _____ meses

51. Você toma bebida alcoólica? 1- sim 2- não (ir para pergunta 51) 9- Faltando

52. Com que frequência você toma bebidas alcoólicas?

- 1- 4 ou mais vezes por semana 2- até 3 vezes por semana 3- 2 vezes por semana 4- 1 vez por mês 5- parei de beber 6- não sabe 9- Faltando

53. Na última ocasião em que você tomou bebidas alcoólicas, o que bebeu e em que quantidade?

- 1- não sabe 2- não se aplica 9- Faltando

BEBIDA	QUANTIDADE				
	Copos	Latas	Cálices	Doses	Garrafas
1- Cerveja ou chopp					
2- Vinho					
3- Destilados (cachaça, rum, vodca, batidas, uísque, etc).					
4- Licores					

54. O que você gosta de fazer nos momentos de lazer?

1- pinturas em geral 2- conserto em carros 3- outros. 9- faltando

Especifique: _____

55. Você faz ou já fez uso de algum medicamento para tratamento de câncer / tumor?

1- sim 2- não

56. Você já faz radioterapia?

1- sim 2- não

57. Você fez exame de raio-X nas últimas duas semanas?

1- sim 2- não

8. BIBLIOGRAFIA

- 01** - RIMAL B., GREENBERG A.K., ROM W.N. Basic Pathogenetic Mechanisms in Silicosis: Current Understanding. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*. 2005; 11:169-173.
- 02** - PRADO A. G. S. & FARIA E. A. Aplicação e Modificação Química da Sílica Gel Obtida de Areia. *Quim. Nova*. 2005; 28(3):544-547.
- 03** - FILHO M.T. & SANTOS U.P. Silicose. *J. Bras. Pneumol*. 2006; 1:541-57.
- 04** - MOORE M. Crystalline Sílica: Occurrence and Use. *Indoor Built Environ*. 1999; 8:82-88.
- 05** - HOLANDA M.Z.M., FELISSIMO P.H. Silicose em cavadores de poços da região de Ibiapaba (CE): da descoberta ao controle *J Pneumol*. 1999; 25(1).
- 06** - CAPITANI E. M., ALGRANTI E. Outras Pneumoconioses. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. 2006; 32(2):S54-S59.
- 07** - FUNDACENTRO. Programa Nacional de Eliminação da Silicose. 2001.
- 08** - RIBEIRO F.S.N, CAMARGO E.A., ALGRANTI E., FILHO V.W. Exposição Ocupacional à Sílica no Brasil no Ano de 2001. *Rev. Bras. Epidemiol*. 2008; 11(1):89-96.

09 - SSDC - SILICOSIS AND SILICATE DISEASE COMMITTEE. Diseases Associated with Exposure to Silica and Nonfibrous Silicate Minerals. Arch Pathol Lab Med. 1988;112(7):673-720.

10 - ATS - AMERICAN THORACIC SOCIETY COMMITTEE. Of the Scientific Assembly on Environmental and Occupational Health Adverse effects of crystalline silica exposure. Am J Respir Crit Care Med. 1997;155(2):761-8.

11 - NIOSH. Hazard Review: Health Effects of Occupational Exposure to Respirable Crystalline Silica. Department of Health and Human Services. Centers for Disease Control and Prevention National Institute for Occupational Safety and Health. 2002.

12 - NETO F. K., GRONCHI C.C., SAAD I. F. S. D., CUNHA I. A., POSSEBON J., TEXEIRA M. M., *et al.* Sílica: Manual do Trabalhador. Fundacentro,1995.

13 - GRUENZNER G. Avaliação da Poeira de Sílica: Um Estudo de Caso em uma Pedreira na Região Metropolitana de São Paulo. Dissertação (Mestrado em Engenharia) – Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, SP. 2003.

14 - TIRIBIÇADON A. M. Exposição Ocupacional à Sílica e Silicose entre Trabalhadores de Marmorarias no Município de São Paulo. Tese (Doutorado em Saúde Ambiental) – Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, SP. 2006.

15 - LIMA M. M. T. M. Características da Poeira do Processo de Fabricação de Materiais Cerâmicos para Revestimento: Estudo no Pólo de Santa Gertrudes. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil). Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo da Universidade Estadual de Campinas, 2007.

16 - CASTRO H., SILVA C. G., VICENTIN G. Estudo das Internações Hospitalares por Pneumoconioses no Brasil, 1984-2003. Rev. Bras. Epidemiol. 2005; 8(2):150-60.

17 - ALGRANTI E. Epidemiologia das Doenças Ocupacionais Respiratórias no Brasil. In: Menezes A. M. B. Epidemiologia das Doenças Respiratórias – Série Pneumologia Brasileira. Rio de Janeiro: Revinter. 2001; 119-43.

18 - IBGE. Demográfico de Censo: Divulgação de Resultados 2002. Disponível em <http://www.ibge.gov.br/home/default.php>. Acessado em 1 de agosto de 2009.

19 - FILHO I.B., SILVA A.E., SZAJUBOK A., LANCELLOTTI C. L. P. A Particular Case of Silica Granuloma in Nasal Mucosa. Rev Bras Otorrinolaringol. 2002; 68(4): 598-603.

20 - DEPARTAMENTO DE ANATOMIA PATOLÓGICA. Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas (FCM-UNICAMP). Site didático de Anatomia Patológica, Neuropatologia e Neuroimagem. Disponível em <http://anatpat.unicamp.br/lamresp24.html>. Acessado em 17 de março de 2009.

21 - MARCHIORI E., DANTAS M.C.H, NOBRE L.P. Silicose: Correlação da Tomografia Computadorizada de Alta Resolução com a Anatomopatologia. Radiol Bras. 2001; 34(1):1.6.

22 - DING M., CHEN F, SHI X., YUCESDY B., MOSSMAN B, VALLYATHAN V. Diseases Caused by Silica: Mechanisms of Injury and Disease development. International Immunopharmacology.2002; 2:173-182.

23 - BARAZZUTTI L.D. Silicose em Processos de Fundição de Peças Frente à Nova Tecnologia. Porto Alegre. Dissertação (Mestrado Profissionalizante em Engenharia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS. 2004.

24 - MARCHIORI E., DANTAS M. C. H., NOBRE F. N. Silicose: Correlação da Tomografia Computadorizada de Alta Resolução com a Anatomopatologia. Radiologia Brasileira. 2001; 34(1):1-6.

25 - CASTRO H. A. Busca de Marcadores Inflamatórios Il-1 β , il-6 e tnf- α em Trabalhadores Expostos a Poeiras Minerais. Rio de Janeiro. Tese (Doutorado em Saúde Pública) – Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, RJ. 2000.

26 - ILO - International Labour Office. Guideline for Use of ILO International Classification of Radiographs of Pneumoconiosis. Geneva: International Labour Office, 2000.

27 - FUBINI B. & HUBBARD A. Reactive Oxygen Species (ROS) and Reactive Nitrogen Species (RNS) Generation by Silica in Inflammation and Fibrosis. *Free Radical Biology & Medicine*. 2003; 34(12):1507-1516.

28 - BARREIROS A. L.B.S. & DAVID J.M. Estresse Oxidativo: Relação da Espécies Reativas e Defesa do Organismo. *Quim. Nova*. 2006; 29(1):113-123.

29 - ISHII T., MATSUSE T. TERAMOTO S. MATSUI H., MIYAO M., HOSOI T, *et al.* Glutathione S-transferase P1 (GSTP1) Polymorphism in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Trorax*. 1999; 54:693-696.

30 - BROOKE T.M., & CHURG A. Mechanisms in the Pathogenesis of Asbestosis and Silicosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998; 157:1666–1680.

31 - ANDRADE V.S.S. Polimorfismos Genéticos, Susceptibilidade e Resposta ao Tratamento em Crianças Portadoras de Leucemia Linfoblástica Aguda. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, SP. 2006.

32 - EKHART C., RODENHUIS S., SMITS P. H. M., BEIJNEN J. H., HUITEMA A. D. R. An Overview of The Relations Between Polymorphism in Drug Metabolising Enzymes and Drug Transporters and Survival after Cancer Drug Treatment. *Cancer Treatment Reviews*. 2009; 35: 18- 31.

- 33** - MILLER M. M., MOHRENWEISER H. W., BELL D. A. Genetic Variability in Susceptibility and Response to Toxicants. *Toxicology Letters*. 2001; 120:269-280.
- 34** - AMORIM L. C. A. Os biomarcadores e sua Aplicação na Avaliação da Exposição aos Agentes Químicos Ambientais. *Rev. Bras. Epidemiol.* 2003; 6(2):148-170.
- 35** - MITRI S. N. Padronização e Aplicação de uma Metodologia para Determinação Polimorfismo da Enzima δ -Aminolevulínico Desidratase na Avaliação de Exposição a Chumbo. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Escola Nacional de Saúde Publica Sérgio Arouca, RJ. 2003.
- 36** - STANILOVA S., MITEVA L. PRAKOVA G. Il-12pro and GSTP1 polymorphisms in Association with Silicosis. *Tissue Antigens*. 2007; 71:169-174.
- 37** - PARL F. F. Glutathione S-Transferase Genotypes and Cancer Risk. *Cancer Letters*. 2005; 221:123-129.
- 38** - FORD J. G., LI Y., SULLIVAN M. M., DEMOPOULOS R., GARTE S., TAIOLI E., RAULF P. W. B. Glutathione S- Transferse M1 Polymorphism and Lung Cancer Risk in Africans-Americans. *Carcinogenesis*. 2000; 21(11):1971-1975.
- 39** - TORRESAN C. Estudo dos Polimorfismos dos Genes GSTM1, GSTT1 e CYP1A1 em Cânceres Mamários Esporádicos. Dissertação (Mestrado em Genética) - Universidade Federal do Paraná, PR. 2006.

- 40** - PEMBLE S., SCHROEDER K. R., SPENCER S. R., MEYER D. J., HALLIER E., BOLT H. M., *et al.* Human Glutathione S-transferase Theta (GSTT1): cDNA Cloning and the Characterization of a Genetic Polymorphism. *Biochem. J.* 1994; 300: 271-276.
- 41** - GASPAR P., MOREIRA J., KVITKO K., TORRES M., MOREIRA A., WEIMER T. CYP1A1, CYP2E1, GSTM1, GSTT1, GSTP1, and TP53 Polymorphisms: They Indicate Susceptibility to Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Non-Small-Cell Lung Cancer? *Genetics and Molecular Biology.* 2004; 27:133-138.
- 42** - KVITKO K., GASPAR P. A., TORRES M.R., WEIMER T.A., HUTZ M. H. CYP1A1, GSTM1, GSTP1 and GSTT1 Polymorphisms in an Afro-Brazilian Group. *Genetics Molecular Biology.* 2006; 29(4).
- 43** - REBBECK T. R. Molecular Epidemiology of The Human Glutathione S-Transferase Genotypes GSTM1 and GSTT1 in Cancer Susceptibility. *Cancer Epidemiol.* 1997; 733-743.
- 44** - COTTON S. C., SHARP L., LITTLE J., BROCKTON N. Glutathione S-Transferase Polymorphisms and Colorectal Cancer: a Huge Review. *Am. J. Epidemiol.* 2000; 151 (1): 7-32.
- 45** - ENGEL L. S., TAIOLI E., PFEIFFER R., GARCIA-CLOSAS M., MARCUS P. M., LAN Q., *et al.* Pooled Analysis and Meta-Analysis of Glutathione S-Transferase M1 and Bladder Cancer: A Huge Review. *Am. J. Epidemiol.* 2002; 156 (2): 95-109.

46 - FRANKO A., DOLZAN A., ARNERIC N., DODIC M .The Influence of Genetic Polymorphisms of GSTP1 on the Development of Asbestosis. *Joem.*2008; 50(1).

47 - ALI-OSMAN F., AKANDE O., ANTOUN G., MAO J., BUOLAMWINI. Molecular Cloning, Characterization, and Expression in *Escherichia coli* of Full-length cDNAs of Three Human Glutathione S-transferase Pi Gene Variants. *The Journal of Biological Chemistry.* 1997; 272(15):10004-10012.

48 - HARRIES L.W., STUBBINS M.J., FORMAN D., HOWARD G. C., WOLF C. R. Identification of Genetic Polymorphisms at the Glutathione S-transferase Pi Locus and Association with Susceptibility to Bladder, Testicular and Prostate Cancer. *Carcinogenesis.*1997; 18(4):641-644.

49 - ROSSINI A., RAPOZO C.M., AMORIM L.M.F., MACEDO J. M. B., MEDINA R., NETO J. F. N., *et al.* Frequencies of GSTM1, GSTT1, and GSTP1 Polymorphisms in a Brazilian population. *Genetics and Molecular Research.* 2002; 1 (3):233-240.

50 - JOURENKOVA-MIRONOVA N., VOHO A., BOUCHARDY C., WIKMAN H., DAYERP, BENHAMOU S., *et al.* Glutathione S-Transferase GSTM1, GSTM3, GSTP1 and GSTT1 Genotypes and the Risk of Smoking-Related Oral and Pharyngeal Cancers. *Int. J. Cancer.* 1999; 81:44–48.

51 - JOURENKOVA-MIRONOVA N., WIKMAN H., BOUCHARDY C., VOHO A., DAYER P., BENHAMOU S., *et al.* Role of Glutathione S-Transferase GSTM1, GSTM3, GSTP1 and

GSTT1 Genotypes in Modulating Susceptibility to Smoking-Related Lung Cancer. Pharmacogenetics. 1998; 8(6):495-502.

52 - CDC - CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Guidelines for preventing the transmission of Mycobacterium tuberculosis in health-care facilities. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 1994; 43(RR-15):1-104.

53 - SAMBOOK J., RUSSEL D. Molecular cloning: A laboratory Manual.2001.

54 - HABIG W. H., PABST M. J., JAKOBY W. B. Glutathione S-Transferases: The First Enzymatic In Mercapturic Acid Formation. The Journal of Biological Chemistry, Baltimore. 1974; 249(22):7130-7139.

55 - COSTA M. F. B., COSTA M. A. F. Exposição Ocupacional a Compostos Orgânicos Voláteis na Indústria Naval. Quim. Nova. 2002; 25(3):384-386.

56 - CARNEIRO A. P. S., CAMPOS L. O., GOMES M. F. C. F., ASSUNÇÃO A. A. Perfil de 300 Trabalhadores Expostos à Sílica atendidos ambulatorialmente em Belo Horizonte. J. Pneumol. 2002; 28(6):329-334.

57 - ZWERLING C., SPRINCE N. L., WALLACE R. B., DAVIS C. S., WHITTEN P. S., HEERINGA S. G., Risk factors for occupational injuries among older workers: An analysis of health and retirement study. American Journal of Public Health. 1996; 86:1306-1309.

58 - CARACCILO C. L. H. O fumo como fator de risco nos portadores de silicose. Universidade Federal Fluminense. 1992.

59 - KURIHARA N. & WADA O. Silicosis and Smoking Strongly Increase Lung Cancer Risk in Silica-Exposed Workers. *Industrial Health*. 2004; 42:303–314.

60 - JUNIOR J. A. M., LOPES A. J., JANSEN J. M., MELO P. L. Avaliação das Características Resistivas do Sistema Respiratório de Indivíduos Portadores de Silicose pela Técnica de Oscilações Forçadas. *J Bras Pneumol*. 2006; 32(3):213-20.

61 - COWIE R. L. The Influence of Silicosis on Deteriorating Lung Function in Gold Miners. *Chest*. 1998; 113:340-343.

62 - EVELO C. T., BOS R. P., BORM P. J. Decreased Glutathione Content and Glutathione S-Transferase Activity in Red Blood Cells of Coal Miners with Early Stages of Pneumoconiosis. *British Journal of Industrial Medicine*. 1993; 50:633-636.

63 - Joca F. J. G. Avaliação de Genotoxicidade de Trabalhadores Expostos à Sílica. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Escola Nacional de Saúde Pública, RJ. 2009.

64 - WATSON M. A., STEWART R. K., SMITH G. B. J., MASSEY T. E., BELL D. A. Human Glutathione S-Transferase P1 Polymorphism: Relationship to Lung Tissue Enzyme Activity and Population Frequency Distribution. *Carcinogenesis*. 1998; 19:275-280.

- 65** - MO Z., GAO Y., CAO Y., GAO F., JIAN L. An Up dating Meta-Analysis of the GSTM1,GSTT1, and GSTP1 Polymorphisms and ProstateCancer: AHuGEReview . The Prostate. 2009; 69:662- 688.
- 66** - HEUSER V. D., ERDTMANNA B., KVITKO K., ROHR P. SILVA J. Evaluation of Genetic Damage in Brazilian Footwear-Workers: Biomarkers of Exposure, Effect, and Susceptibility. Toxicology. 2007; 232 (3):235-247.
- 67** - KIM J.H., PARK S.G., LEE K.H. CHOI J. H., HA E. H., MYUNG S. K., *et al.* GSTM1 and GSTP1 polymorphisms as Potential Factors for Modifying the Effect of Smoking on Inflammatory response. J. Korean Med. Sci. 2006; 21:1021-7.
- 68** - ARRUDA V. R., GRINOLLI C. E., GONÇALVES M. S., SOARES M. C., MENEZES R., SAAD S. T. O., *et al.* 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 Genet. 1998;54:210-214.
- 69** - HATAGIMA A., GUIMARÃES M. J. K., SILVA F. P., CABELLO P. H. Glutathione S-Transferase M1 (GSTM1) Polymorphism in Two Brazilian populations. Genet. Mol. Biol. 2000; 23:709-713.
- 70** - PAIVA S. C., SANTOS N. P.C., FERNANDES D. C. R. O., RIBEIRO DOS SANTOS A. K. C., HUTZ M. H., SANTOS S. E. B. Investigação de Possível Associação entre o Alelo Nulo do Gene GSTM1 e o Desenvolvimento de Hepatotoxicidade em Resposta ao Tratamento com

Isoniazida, em Pacientes Portadores de Tuberculose do Estado do Pará. Resumos do 55º Congresso Brasileiro de Genética, 2009

71 - KORYTINA G. F., YANBAEVA D. G., VICTOROVA T. V. Polymorphism of Glutathione S-Transferase M1 and P1 in Patients with Cystic Fibrosis and Chronic Respiratory Diseases. Russian Journal of Genetics. 2004; 40(3):314–320.