

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E BIOLÓGICAS
INSITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO, GENOTOXICIDADE E
MUTAGENICIDADE EM TRABALHADORES EXPOSTOS A TINTAS**

Carina Cassini

Caxias do Sul

2009

Carina Cassini

**AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO, GENOTOXICIDADE E
MUTAGENICIDADE EM TRABALHADORES EXPOSTOS A TINTAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando a
obtenção de grau de Mestre em Biotecnologia

Orientadora: Profa. Dra. Mirian Salvador

Co-orientador: Prof. Dr. Bernardo Erdtmann

Caxias do Sul

2009

AGRADECIMENTOS

Ao final desse trabalho, gostaria de agradecer:

À minha orientadora Profa. Dra. Mirian Salvador, pela confiança, estímulo e auxílio para a realização deste trabalho em todos os momentos. Também a agradeço pela amizade cultivada durante esses dois anos de mestrado e nos cinco anos anteriores de iniciação científica.

Ao meu co-orientador Dr. Bernardo Erdtmann pela amizade e todas as importantes contribuições e esclarecimentos.

A todos os colegas e amigos do laboratório de Estresse Oxidativo e Antioxidantes, que trabalharam como uma verdadeira equipe. Todos contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho.

Agradeço especialmente à bolsista de iniciação científica Caroline Calloni pela amizade, por ter me auxiliado em muitas etapas do trabalho, nunca hesitando em disponibilizar o seu tempo extra para ficar no laboratório.

Às bolsistas de iniciação científica Morgana Variani, Giovana Bortolini e Karine Giasson, pela dedicação, amizade e auxílio.

À Dra. Caroline Dani, Gabriela Gambato e Adriana Dalpicolli Rodrigues, por todas as contribuições e auxílio especialmente na realização das coletas.

À Dra. Solange Garcia, Ângela Moro e Rachel Bulcão, pela parceria, disponibilidade e realização de algumas etapas deste trabalho.

Agradeço ao colega e amigo Gustavo Scola pela colaboração, incentivo e apoio em todos os momentos da realização deste estudo.

Às colegas e amigas Fabiane Michelin e Dra. Mariana Hoesch, pelo apoio e contribuições.

À Dra. Ana Cristina Andreazza por todas as contribuições e sugestões.

À contribuição dos pesquisadores Dr. João Antônio Pegas Henriques e Dr. Daniel Prá.

Agradeço à Dra. Patrícia Spada, pela amizade e auxílio desde a minha iniciação no laboratório.

À comissão de acompanhamento, Dr. Diego Bonatto e Dra. Suélen Paesi, pelas indispensáveis sugestões e críticas.

A todas as empresas que aceitaram participar da pesquisa, tornando possível a realização deste estudo.

Ao 5º. Comando regional de bombeiros de Caxias do Sul pela participação e interesse fundamentais para a realização deste trabalho.

À minha família, amigos e, especialmente, ao meu namorado, Mauro, pela paciência e apoio indispensáveis ao sucesso deste trabalho.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	VI
LISTA DE TABELAS.....	VII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	VIII
RESUMO	X
ABSTRACT	XII
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 COMPOSIÇÃO DAS TINTAS	3
2.2 ESTRESSE OXIDATIVO.....	4
2.3 GENOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE.....	9
2.4 TOXICIDADE DAS TINTAS E DE SEUS PRINCIPAIS COMPOSTOS.....	16
3. OBJETIVOS	21
3.1. OBJETIVO GERAL	21
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
4. RESULTADOS	22
OXIDATIVE STRESS AND GENOTOXICITY IN WORKERS OCCUPATIONALLY EXPOSED TO PAINTS	23
5. DISCUSSÃO GERAL	500
6. CONCLUSÕES	57
7. PERSPECTIVAS.....	59
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61
9. ANEXOS	81
APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA DA UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL.....	82
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	84
QUESTIONÁRIO DE SAÚDE OCUPACIONAL.....	87

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Imagens das classes 0 – 4 de danos no DNA analisados visualmente pelo ensaio cometa.....11
- Figura 2** Célula binucleada contendo micronúcleo (A), ponte nucleoplásmica (B) e nuclear bud (C), pelo método de bloqueio da citocinese.....13

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Classificação de alguns solventes e pigmentos presentes nas tintas segundo sua periculosidade (ONU) e carcinogenicidade (IARC).....	5
---	---

LISTA DE ABREVIATURAS

DNA	<i>Ácido Desoxirribonucléico</i>
ER	Espécies Reativas
TBARS	<i>Espécies Reativas com o Ácido Tiobarbitúrico</i>
PC	Proteínas Carboniladas
Sod	Superóxido dismutase
ECSod	Superóxido dismutase extracelular
Cat	Catalase
AH	Ácido Hipúrico
ALA	Ácido Delta-Aminolevulínico
MN	Micronúcleos
NBUDS	<i>Nuclear buds</i>
IDN	Índice de Divisão Nuclear
ONU	Organização das Nações Unidas
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
EPIs	Equipamentos de Proteção Individuais
RL	Radical Livre
MDA	Malondialdeído
BER	<i>Reparo por excisão de bases</i>
NER	<i>Reparo por excisão de nucleotídeos</i>

DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazina
EDTA	<i>ácido etilenodiaminotetracético</i>
NPBs	<i>pontes nucleoplásmicas</i>

RESUMO

A exposição a tintas, as quais contêm solventes orgânicos e metais, pode levar a danos no DNA e formação de espécies reativas (ER), que podem lesar diversas classes de moléculas. Em vista disso, este trabalho teve como objetivo avaliar possíveis danos oxidativos, genotóxicos e mutagênicos em 33 indivíduos, do sexo masculino, ocupacionalmente expostos a tintas há, no mínimo, 6 meses. Para o grupo controle, foram selecionados 29 indivíduos saudáveis, não expostos a tintas, pareados em idade com o grupo exposto. A fim de verificar a influência do descanso do fim de semana, foram realizadas coletas na segunda-feira pela manhã e na sexta-feira ao final da jornada de trabalho. Os danos oxidativos foram avaliados pelos produtos de reação com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), proteínas carboniladas (PC) e atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (Sod) e catalase (Cat). Foram medidos, ainda, o ácido hipúrico (AH) e o ácido delta-aminolevulínico (ALA), marcadores urinários de exposição ao tolueno e ao chumbo, respectivamente. A genotoxicidade foi avaliada pelo ensaio cometa (em sangue periférico) e pelo teste de micronúcleos (MN) (em linfócitos e células da mucosa bucal). Não foi observado aumento significativo nos níveis de TBARS no grupo exposto quando comparado ao grupo controle. Entretanto, verificou-se, neste grupo, um maior índice de danos aos lipídeos nas amostras coletadas na sexta-feira comparado com as amostras coletadas na segunda-feira ($p = 0,008$; $z = -2,637$). Ao final da semana (amostras coletadas na sexta-feira), os indivíduos expostos a tintas apresentaram mais danos às proteínas em comparação com o

grupo controle ($p = 0,032$; $z = -2,14$). Observou-se também, que os trabalhadores expostos a tintas tiveram uma diminuição nas atividades de Sod ($p = 0,003$; $z = 2,935$) e Cat ($p = 0,025$; $z = -2,247$) nas amostras de segunda-feira, bem como valores mais elevados de AH ($p = 0,010$; $z = -2,591$) e de ALA ($p = 0,000$; $z = -4,487$).

A exposição a tintas induziu um aumento significativo dos danos ao DNA (principalmente classes um e dois), tanto nas amostras coletadas na segunda ($p = 0,000$; $z = -5,356$) quanto nas de sexta-feira ($p = 0,000$; $z = -6,456$). Apesar de não ter sido encontrado um aumento na frequência de MN em linfócitos ou em células da mucosa bucal no grupo exposto, observou-se um aumento de *nuclear buds* (NBUDs) (segunda-feira, $p = 0,004$, $z = -2,894$), uma diminuição do índice de divisão nuclear (IDN) (sexta-feira, $p = 0,000$, $z = -4,78$) nos linfócitos e um aumento na frequência de células com cromatina condensada nas células da mucosa bucal (segunda-feira, $p = 0,000$, $z = -4,503$; sexta-feira, $p = 0,000$, $z = -5,203$), indicativo de amplificação gênica e indução de mecanismos apoptóticos nestas células. Observou-se uma correlação positiva entre o índice de danos no DNA (ensaio cometa) e o tempo de exposição a tintas ($\rho = 0,376$; $p = 0,031$), assim como entre o tempo diário de exposição a tintas e a frequência de micronúcleos (segunda-feira, $\rho = 0,450$; $p = 0,018$) e de NBUDs (sexta-feira, $\rho = 0,402$; $p = 0,038$) nos indivíduos expostos. Embora outros estudos sejam necessários, esses resultados mostram que a exposição ocupacional a tintas pode induzir um aumento de danos no DNA, os quais parecem estar sendo reparados durante o descanso do final de semana.

ABSTRACT

Organic solvents and metals, widely used in paints, can lead to DNA damages and reactive species (RS) generation. The aim of this study was to evaluate possible oxidative, genotoxic and mutagenic damages in 33 male workers exposed for at least six months to paint. To constitute the control group 29 healthy individuals were chosen, without paint exposure, which matched in age with exposed group. Two samplings were performed to verify a possible DNA repair during the weekend: in the beginning and at the end of work week. The oxidative damages were evaluated by thiobarbituric acid reaction products (TBARS), carbonylated proteins (CP), superoxide dismutase (Sod) and catalase (Cat) activities. Hippuric acid (HA) and delta-aminolevulinic acid (ALA) were used as toluene and lead markers exposure, respectively. The genotoxicity was evaluated by comet assay (in peripheral blood) and by micronucleus (MN) test (in lymphocytes and exfoliated buccal cells). The results showed no significant increase in TBARS levels in exposed group in relation to the control group. However, the lipidic damages were higher in Friday samples comparing to Monday samples ($p = 0.008$; $z = -2.637$). The proteins damage was higher in exposed group in comparison to control group exclusively in Friday samples ($p = 0.032$; $z = -2.14$). It was also observed that the workers exposed to paints showed lower Sod ($p = 0.003$; $z = 2.935$) and Cat ($p = 0.025$; $z = -2.247$) activities in Monday samples. The exposed group presented HA levels ($p = 0.010$; $z = -2.591$) and ALA levels ($p = 0.000$; $z = -4.487$) higher than the control group.

The workers exposed to paints presented a significant increase in DNA damage in both Monday ($p = 0.000$; $z = -5.356$) and Friday ($p = 0.000$; $z = -6.456$) samples. No increase was observed in MN frequency in lymphocytes and buccal cells. However, the individuals exposed to paints showed an increase in nuclear buds (NBUDS) (Monday samples, $p = 0.004$, $z = -2.894$), a reduction in nuclear division index (NDI) (Friday samples, $p = 0.000$, $z = -4.78$) in lymphocytes and an increase in condensed chromatin frequency in buccal cells (Monday samples, $p = 0.000$, $z = -4.503$; Friday samples, $p = 0.000$, $z = -5.203$), indicating genic amplification and apoptosis induction. The DNA damage index (comet assay) correlated positively with average working time ($\rho = 0.376$; $p = 0.031$). It was also observed a positive correlation between time daily exposure and MN (Monday samples, $\rho = 0.450$; $p = 0.018$) and NBUDs (Friday samples: $\rho = 0.402$; $p = 0.038$) frequency. These results showed that paint exposure is able to generate DNA damages and these damages are being repaired during the weekend.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil, país com um parque industrial diversificado, registrou em 2007, 1277 casos de intoxicação humana de origem ocupacional causadas por produtos químicos industriais, sendo que 458 destes registros ocorreram na região Sul do país (Sistema Nacional de Informações Tóxico Farmacológicas, 2007).

A cidade de Caxias do Sul, um importante pólo industrial do Estado do Rio Grande do Sul, tem sua economia representada, principalmente, pela indústria metal mecânica, cujo faturamento, de janeiro a julho de 2009, foi de, aproximadamente, 5 bilhões de reais (Sindicato das indústrias metalúrgicas, mecânicas e de material elétrico de Caxias do Sul, 2009). A cidade destaca-se na produção de tratores, ônibus, caminhões, carrocerias e partes de veículos, sendo que as empresas de chapeação e pintura desempenham um papel de grande importância como indústrias de base.

De modo geral, as tintas são constituídas por uma mistura complexa de solventes orgânicos e metais, que apresentam toxicidade variada. Alguns dos componentes das tintas, como tolueno e xileno podem provocar sérios danos ao sistema nervoso central (Bruckner & Warren, 2001). O chumbo causa uma série de disfunções hematológicas, neuropatia periférica, e danos renais, entre outros (Goyer & Clarkson, 2001). Outros efeitos como problemas cardiovasculares, hepáticos, respiratórios, contribuição para o desenvolvimento de câncer e perda de audição estão relacionados a alguns compostos presentes nas tintas (Boffeta *et al.*,

1997; Chen *et al.*, 1999; Kaukianen *et al.*, 2004; Park, *et al.*, 2006; Bardin-Mikolajczak *et al.*, 2007; Scélo *et al.*, 2009; Chang *et al.*, 2009). Além disso, muitos solventes e metais podem induzir danos oxidativos a proteínas, lipídeos e, inclusive, ao DNA (Costa *et al.*, 2006; Beyersmann & Hartwig, 2008; Chen *et al.*, 2008).

Embora existam vários estudos sobre a toxicidade de compostos presentes nas tintas (Valko *et al.*, 2005 ; Costa *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2008), os dados acerca dos efeitos tóxicos resultantes da exposição ocupacional ainda são controversos (Karagözler *et al.*, 2002 ; Akzoy *et al.*, 2006 ; Cárdenas-Bustamante *et al.*, 2007). Em vista disso, este trabalho avaliou os níveis de danos oxidativos e os possíveis efeitos genotóxicos e/ou mutagênicos em 33 trabalhadores ocupacionalmente expostos a tintas. Considerando, ainda, os dados obtidos em nosso laboratório, que mostraram que manipuladores de drogas antineoplásicas podem reparar danos ao DNA durante o final de semana (Rombaldi *et al.*, 2009), foram coletadas amostras antes do início da jornada de trabalho (segunda-feira de manhã) e ao final da exposição semanal (sexta-feira no final da tarde).

Espera-se que os resultados obtidos neste estudo possam contribuir com o esclarecimento das condições capazes de gerar danos a saúde dos trabalhadores, auxiliando, desta forma, na prevenção de doenças decorrentes da exposição ocupacional.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Composição das tintas

Tintas são revestimentos que têm a função de proteger e prover estética à superfície onde são aplicadas. São complementares aos produtos fabricados por diversos outros setores da economia, como o automobilístico, de construção civil, naval, aeronáutico, de eletrodomésticos, tratores e implementos agrícolas, motocicletas, madeiras e móveis, ônibus e caminhões. Também são utilizadas para manutenção industrial, atuando como anticorrosivos (Lambourne, 1999).

As tintas são compostas por uma fração sólida, formada pelos pigmentos e resinas e uma fração volátil (solventes). Os pigmentos são substâncias naturais ou sintéticas, de origem orgânica ou inorgânica, utilizados para conferir cor, opacidade e algumas características de resistência. Muitos pigmentos contêm metais como titânio, ferro, alumínio, cádmio, cobalto e algumas tintas podem conter, ainda, chumbo. As resinas agregam os constituintes sólidos e são as principais responsáveis pelas propriedades de flexibilidade, resistência a abrasão, resistência a álcalis e adesão. Geralmente as resinas são polímeros, tais como poliésteres (ácidos graxos sintéticos hidroxilados); poliuretanos; resinas epóxi; ou resinas acrílicas (Lambourne, 1999; Brukner & Warren, 2001).

O solvente é o componente predominante da tinta e é utilizado para a dissolução dos pigmentos e resinas. Entre os principais solventes empregados estão os hidrocarbonetos

alifáticos (geralmente contendo cloro, como o tricloroetileno e o diclorometano); hidrocarbonetos aromáticos (tolueno, xileno, etilbenzeno, estireno e benzeno); álcoois (especialmente metanol e etanol); glicóis (etileno e propileno glicol); ésteres (especialmente os acetatos de butila e de etila); aminas, aldeídos e cetonas (Fazenda, 1995; Brukner & Warren, 2001).

A Organização das Nações Unidas (ONU) reúne os compostos em classes, de acordo com sua periculosidade, sendo os pertencentes à classe 1, os explosivos; à classe 2, gases comprimidos, liquefeitos e/ou dissolvidos sob pressão (inflamáveis e/ou tóxicos); à classe 3, líquidos inflamáveis; à classe 4, sólidos inflamáveis; à classe 5, oxidantes e/ou peróxidos; à classe 6, substâncias tóxicas e/ou infectantes; à classe 7, radioativos; à classe 8, corrosivos; e à classe 9, substâncias perigosas diversas. Além disso, os possíveis efeitos carcinogênicos dos solventes e pigmentos são definidos pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC) como: grupo 1, compostos considerados carcinogênicos para humanos; grupo 2A, provavelmente carcinogênicos para humanos; grupo 2B, possivelmente carcinogênicos para humanos; grupo 3, não classificado quanto a sua carcinogenicidade; e grupo 4, provavelmente não carcinogênico para humanos. A Tabela 1 apresenta a classificação dada pela ONU e pela IARC, quanto à periculosidade e à carcinogenicidade de alguns dos compostos presentes nas tintas.

2.2 Estresse oxidativo

Um radical livre (RL) é uma espécie química (átomo ou molécula) que possui um elétron desemparelhado no seu orbital de valência. Essa situação confere ao radical uma alta reatividade química, especialmente como agente oxidante, pela tendência de adquirir o segundo elétron para estabilizar o seu orbital de valência (Halliwell & Gutteridge, 2007).

Tabela 1. Classificação de alguns solventes e pigmentos presentes nas tintas de acordo com sua periculosidade (ONU) e carcinogenicidade (IARC).

	Classe definida pela ONU		Grupo definido pela IARC	
Etileno	2	<i>Gás inflamável</i>	3	<i>Não classificado quanto a sua carcinogenicidade em humanos</i>
Etilbenzeno	3	<i>Líquido inflamável</i>	2B	<i>Possivelmente carcinogênico para humanos</i>
Metanol	3	<i>Líquido inflamável</i>	Nc	-
Tricloroetileno	Nc	-	2A	<i>Provavelmente carcinogênico para humanos</i>
Tolueno	3	<i>Líquido inflamável</i>	3	<i>Não classificado quanto a sua carcinogenicidade em humanos</i>
Xileno	3	<i>Líquido inflamável</i>	3	<i>Não classificado quanto a sua carcinogenicidade em humanos</i>
Cádmio	6	<i>Substância tóxica*</i>	1	<i>Carcinogênico para humanos</i>
Cobalto	4	<i>Sólido inflamável</i>	2B	<i>Possivelmente carcinogênico para humanos</i>
Chumbo	6	<i>Substância tóxica</i>	2B	<i>Possivelmente carcinogênico para humanos</i>
Dióxido de titânio	Nc	-	2B	<i>Possivelmente carcinogênico para humanos</i>

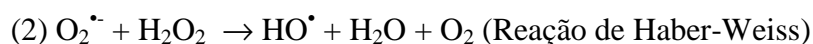
nc: não classificado

*capaz de provocar morte, lesões graves ou danos à saúde humana, se ingerida ou inalada, ou quando em contato com a pele.

Em nosso organismo são produzidos radicais livres de carbono, enxofre, nitrogênio e oxigênio, mas o que ganha mais destaque devido à reatividade e aos danos que podem causar são os radicais derivados do oxigênio. O termo espécies reativas (ER) é um termo coletivo, frequentemente usado para incluir não apenas radicais livres, mas também alguns compostos não radicalares capazes de gerar RL, como por exemplo, o peróxido de hidrogênio (Halliwell & Gutteridge, 2007).

Dentre as principais ER estão o superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (HO^{\bullet}). O $O_2^{\bullet-}$ é capaz de reagir com centros ferro-enxofre de enzimas, produzindo um prejuízo ou disfunção enzimática e também possui a característica de reagir rapidamente com o ácido nítrico, produzindo o ânion peroxinitrito ($ONOO^-$) que, apesar de

sua meia-vida curta, pode atravessar a membrana e reagir com biomoléculas, sendo tóxico (Denicola & Radi, 2005). O H₂O₂ não possui alta reatividade *in vivo*, mas é extremamente deletério porque tem vida longa, atravessa facilmente a membrana plasmática e reage com proteínas ligadas ao ferro. Além disso, se esta ER não for decomposta por sistemas enzimáticos de defesa, poderá produzir o radical HO•, que é altamente reativo às proteínas, aos lipídeos e ao DNA (Halliwell & Gutteridge, 2007). A formação de HO• a partir de H₂O₂ ocorre através das reações de Fenton e Haber-Weiss (Valko *et al.*, 2005), conforme descrito a seguir:



A fim de prevenir possíveis danos provocados pelas ER, existem sistemas de defesas antioxidantes não enzimáticos e enzimáticos. Entre os antioxidantes não enzimáticos pode-se citar o ácido ascórbico, vitamina E, carotenóides e compostos fenólicos, normalmente presentes na dieta (Halliwell & Gutteridge, 2007). Entre as principais enzimas antioxidantes estão a superóxido dismutase (Sod) e a catalase (Cat) (Bonney *et al.*, 2002).

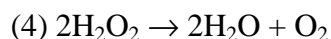
A Sod dismuta o radical O₂^{•-} à H₂O₂ (reação 3), que é menos reativo e pode ser degradado por outras enzimas, tal como a catalase (Halliwell & Gutteridge, 2007). Em células eucariotas, existem várias isoformas para Sod, geralmente localizadas em compartimentos celulares distintos (Fridovich, 1998). A Sod1 ou SodCuZn se encontra quase que exclusivamente no espaço citoplasmático intracelular (Zelko *et al.*, 2002; Fridovich, 1998). A Sod2 ou SodMn, pode ser encontrada na mitocôndria da maioria das células eucariotas (Fridovich, 1998). A Sod3 ou ECSod possui um peptídeo sinalizador que a direciona

exclusivamente para o espaço extracelular. Essa enzima existe como um tetrâmero de 135kDa de massa molecular e já foi detectada no plasma, linfa e fluido cerebrospinal (Zelko *et al.*, 2002).



A atividade da Sod pode ser medida por método espectrofotométrico indireto negativo, isto é, através de uma reação aonde a presença da enzima inibe a formação do produto colorido resultante da interação entre o indicador (adrenalina, por exemplo) e o radical superóxido (Bannister & Calabrese, 1987).

Visto que a atividade da Sod gera H_2O_2 , este pode ser decomposto pela catalase em água e oxigênio molecular, conforme a reação 4 (Halliwell & Gutteridge, 2007). A Cat é um tetrâmero formado por unidades idênticas, sendo que cada monômero contém um grupo prostético heme no centro catalítico (Ursini *et al.*, 1997). Em animais, a catalase está presente em concentrações elevadas no fígado e nos eritrócitos, mas é possível detectá-la em todos os órgãos em concentrações mais baixas (Halliwell & Gutteridge, 2007). Subcelularmente, essa enzima está ampla ou complemente localizada nos peroxissomos. A isoforma de Cat sérica possui a mesma massa molecular da eritrocitária, mas diferente mobilidade eletroforética (Góth, 1991).



A atividade da Cat pode ser avaliada, espectrofotometricamente, através do consumo de peróxido de hidrogênio adicionado no meio de reação (Aebi, 1984).

Glutationa e peroxirredoxinas

Quando é gerado um aumento de espécies reativas em relação à disponibilidade de antioxidantes, ocorre uma condição denominada estresse oxidativo. Essa situação pode resultar da diminuição de antioxidantes por mutações que levam ao decréscimo das defesas

endógenas; depleção de antioxidantes ou de constituintes essenciais (cobre, ferro, zinco, magnésio) na dieta e/ou aumento da produção de espécies reativas por diversas situações como, por exemplo, pela exposição a agentes tóxicos. O estresse oxidativo está associado a processos fisiológicos como o envelhecimento, e a várias doenças, entre elas, câncer, *diabetes mellitus* e doenças degenerativas como Parkinson e Alzheimer (Halliwell & Gutteridge, 2007).

Os lipídeos são alvos fáceis das ER e, normalmente, aparecem oxidados em condições de estresse oxidativo. O dano aos lipídeos ocorre através de reações em cadeia, iniciando com ataque de uma ER e provocando um aumento da permeabilidade da membrana celular para substâncias que normalmente não cruzam a bicamada lipídica (cálcio, por exemplo) levando a inúmeros eventos intracelulares. Entre os produtos finais da peroxidação lipídica estão os compostos de baixo peso molecular, como hidrocarbonetos (etano e pentano) e aldeídos como, por exemplo, o malondialdeído (MDA). O MDA pode lesar proteínas e também reage com o DNA, sendo a guanina a base mais danificada (Esterbauer & Cheeseman, 1990; Halliwell & Gutteridge, 2007). A determinação dos produtos de reação com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) é um importante indicativo dos níveis de dano oxidativo lipídico em humanos. Esse método detecta não somente o MDA mas também outros aldeídos produzidos na lipoperoxidação (Halliwell & Gutteridge, 2007).

Como mencionado, diversas biomoléculas podem ser danificadas sob condição de estresse oxidativo. A determinação de proteínas oxidadas pode ser considerada um importante e sensível marcador de estresse oxidativo (Chakravarti & Chakravarti, 2007). Em geral, o conteúdo de proteínas carboniladas pode ser usado como um indicador global de oxidação protéica (Levine *et al.*, 1990; Chakravarti & Chakravarti, 2007). Agentes oxidantes como radiação, oxidação catalisada por metais, ácido hipocloroso e ozônio podem induzir a formação de grupos carbonílicos nas proteínas. O processo de carbonilação protéica pode ocorrer pela oxidação direta dos aminoácidos das cadeias laterais; pela interação das proteínas

com produtos finais da peroxidação lipídica como 4-hidroxinonenal e o MDA e também através de reações de glicação (Chakravarti & Chakravarti, 2007). A reação dos grupos carbonílicos com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) formando 2,4-dinitrofenilhidrazona tem sido bastante utilizada como método de avaliação do conteúdo de proteínas carboniladas (Levine, 1990).

2.3 Genotoxicidade e mutagenicidade

A lesão genotóxica é uma alteração química e/ou física em um ácido nucléico que leva ao prejuízo de funções como a replicação e a transcrição, processos que necessitam da integridade do DNA. As lesões genotóxicas podem ser quebras simples, quebras duplas, ligações cruzadas entre as fitas de DNA, entre DNA e proteínas e entre DNA e xenobióticos, distorções na hélice, formação de dímeros, pontes intercadeias, alquilações, perda e oxidações de bases, entre outras (Pages & Fuchs, 2002; Luch, 2005; Houtgraaf *et al.*, 2006; Roos & Kaina, 2006).

Para avaliar o possível impacto da exposição ocupacional sobre a saúde, é essencial identificar os efeitos da exposição aos agentes genotóxicos, reconhecer as condições de exposição que geram danos e monitorar indivíduos que possam estar sofrendo exposição excessiva, com o objetivo de prevenir conseqüências adversas sobre a população (Maluf & Erdtmann, 2003). O método de eletroforese de célula única em gel, também conhecido como ensaio cometa, foi proposto por Singh *et al.* (1988) para avaliar danos no DNA induzidos por agentes químicos e/ou físicos (Valverde & Rojas, 2009). Esse método não detecta mutações, mas sim lesões genômicas que, se não reparadas, podem resultar em mutações.

O ensaio cometa tem sido utilizado para estudos de toxicogenética devido as suas vantagens, quando comparado a outros testes para detecção de genotoxicidade. É uma técnica

rápida, sensível, de custo relativamente baixo e de simples realização (Silva *et al.*, 2000; Tice *et al.*, 2000). Além disso, o teste pode ser realizado em uma suspensão celular contendo uma população pequena de células, em proliferação ou não, e corresponde a um teste citogenético (Hartmann *et al.*, 1994; Contijo & Tice, 2003).

Para a realização do ensaio cometa, as células são embebidas em agarose, suas membranas são rompidas com o uso de detergentes em pH alcalino, e as proteínas nucleares são removidas com uso de altas concentrações salinas. Dessa maneira, permanece na lâmina apenas o remanescente de núcleo. Quando a lâmina é submetida ao campo elétrico, o DNA do núcleo migra no gel de acordo com o seu tamanho. Os fragmentos pequenos migram com uma velocidade maior que a matriz nuclear. Assim sendo, os fragmentos do DNA danificado apresentam o aspecto de um cometa e a extensão da migração correlaciona-se diretamente com a quantidade de dano ocorrido (Tice *et al.*, 2000; Valverde & Rojas, 2009). O protocolo de realização desse teste na versão alcalina é o mais empregado por ser mais abrangente, pois além de detectar danos diretos, ele possibilita a avaliação de danos indiretos como lesões por metilação e adutos, os quais, sendo álcali-lábeis, expressam-se como quebras simples frente ao tratamento alcalino. Esses danos podem ser induzidos por várias substâncias químicas como agentes intercalantes, alquilantes e oxidantes (Singh *et al.*, 1988; Tice *et al.*, 2000; Collins *et al.*, 2008).

A análise dos resultados pode ser realizada visualmente em microscópio óptico após coloração das células com nitrato de prata, ou em microscópio de fluorescência, quando as células forem coradas com brometo de etídio, laranja de acridina ou iodeto de propídeo. Os danos são classificados de acordo com o tamanho da cauda em relação à cabeça (núcleo) em 4 classes: classe 0: sem cauda (sem dano); classe 1: com uma pequena cauda menor que o diâmetro da cabeça; classe 2: com o comprimento da cauda entre uma e duas vezes o diâmetro

da cabeça; classe 3: com uma cauda longa, superior a duas vezes o diâmetro da cabeça; classe 4: cauda longa e espalhada em forma de leque (Figura 1).

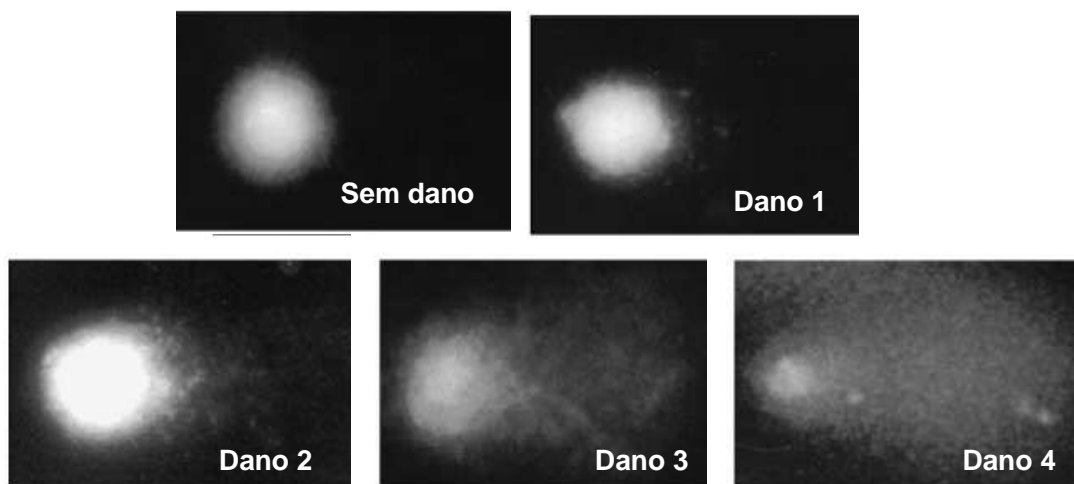


Figura 1. Imagens das classes 0 – 4 de danos no DNA analisados visualmente pelo ensaio cometa (adaptado de Heuser *et al.*, 2007).

Quando uma lesão genotóxica não é reparada antes da divisão celular, tem-se uma situação que, freqüentemente, acarreta eventos recombinacionais, aberrações cromossômicas e instabilidade genômica (Hanawalt & Spivak, 2008; Baute & Depicker, 2008). As mutações são, classicamente definidas como alterações no DNA. Elas podem ser gênicas (ou pontuais) quando o gene muda, tornando-se um alelo diferente; ou cromossômicas, quando a alteração ocorre a nível cromossômico (Griffiths *et al.*, 2002). Entretanto, alguns processos, como a recombinação gênica da meiose, são naturais e intrínsecos do DNA e não são classificados como mutação (Erdtmann, 2003).

As mutações, apesar de essenciais para a manutenção da espécie, também estão envolvidas na patogênese de muitas doenças. Muitas das mutações não implicam em mudanças detectáveis na atividade metabólica da célula ou do organismo e, portanto, passam despercebidas. Sendo assim, alguns dos efeitos da exposição a agentes genotóxicos se

expressam imediatamente, enquanto outros levam anos ou gerações para se manifestar. Efeitos tardios bem reconhecidos incluem a indução do câncer e doenças genéticas nas gerações seguintes (Maluf & Erdtmann, 2003).

As anormalidades na estrutura do cromossomo podem ser uma consequência de quebras duplas de DNA não reparadas, e os rearranjos cromossômicos, uma consequência do reparo incorreto de quebras na fita de DNA. A perda de cromossomos e os erros de segregação são eventos importantes na carcinogênese, causados provavelmente por defeitos na formação de fuso ou de centrômero (Fenech, 2000). O ensaio de micronúcleos (MN), proposto por Schmid (1975) e Heddle (1973) é atualmente um dos testes citogenéticos mais bem estabelecido, com validação internacional e aplicável a qualquer população celular nucleada (Fenech, 2000).

Os micronúcleos são originários de quebras de cromossomos que, por não possuírem centrômero, não puderam se ligar às fibras cinetocóricas nem migrar para os pólos opostos da célula juntamente com os demais cromossomos durante a anáfase. Na telófase, tanto da mitose quanto da meiose, a membrana nuclear é refeita ao redor do conjunto de cromossomos. Os fragmentos acêntricos ou até mesmo um cromossomo inteiro que não estiver ligado ao fuso mitótico é incapaz de integrar-se aos novos núcleos. Em razão disso, esses fragmentos formam um pequeno núcleo individual, denominado micronúcleo, o qual é detectado em células interfásicas como um pequeno corpúsculo arredondado de cromatina, separado do núcleo principal (Figura 2) (Fenech, 2006; Fenech, 2007).

A avaliação da frequência de micronúcleos é considerada um índice de quebras cromossômicas e de perda cromossomal que pode ser detectado em células que tenham completado ao menos uma divisão celular, sendo desejável a avaliação no estágio de células binucleadas. Para atingir esse estágio o método de bloqueio da citocinese com citocalasina B foi estabelecido (Fenech, 2006). Nesse método, as células que completaram uma divisão

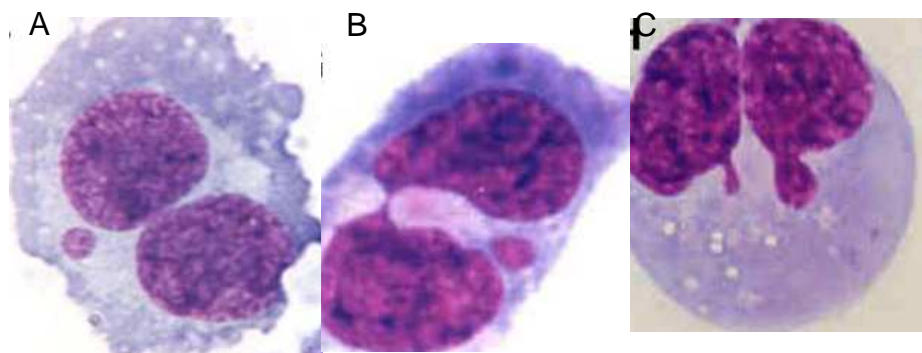


Figura 2. Célula binucleada contendo micronúcleo (A), ponte nucleoplásmica (B) e *nuclear bud* (C), detectadas pelo método de bloqueio da citocinese (adaptado de Fenech, 2006).

nuclear são bloqueadas no momento da citocinese por ação da citocalasina B e são identificadas pelo aspecto binucleado. A citocalasina B inibe a polimerização da actina, processo necessário para a formação dos microfilamentos que constriem o citoplasma entre os núcleos filhos durante a citocinese (Fenech, 2000). Dessa forma, o uso da citocalasina B possibilita o acúmulo das células em divisão no estágio binucleado na população, independente da sincronização e proporção de células em divisão (Fenech, 2006).

Ocasionalmente, podem ser observadas pontes nucleoplásmicas (Figura 2B) entre os núcleos, as quais correspondem a cromossomos dicêntricos em que os centrômeros foram puxados para os pólos opostos da célula, constituindo-se assim, em um indicativo de rearranjo cromossômico. Também pode ser medido, através dessa técnica, os *nuclear bud* (NBUDs) (Figura 2C), marcadores de amplificação gênica. O DNA amplificado pode ser eliminado através da recombinação entre regiões homólogas contendo sequências amplificadas formando minicírculos de DNA acêntrico e atelomérico, ou através da excisão de sequências amplificadas depois da segregação para regiões distintas do núcleo (Fenech, 2006).

O teste de micronúcleos permite, ainda, avaliar o índice de divisão nuclear (IDN), o qual fornece informações sobre um possível efeito citostático. Para isso, verifica-se a

frequência de células com 1, 2, 3 ou 4 núcleos em, no mínimo, 500 células e o IDN é calculado utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{IDN} = (\text{M1} + 2\text{M2} + 3\text{M3} + 4\text{M4}) / \text{N},$$

onde M1 – M4 representa o número de células com 1 – 4 núcleos e N é o total de células viáveis contadas (Fenech, 2007).

Os micronúcleos podem ser medidos em cultura de diversos tipos de células (como por exemplo, de linfócitos humanos) ou em células que possuam rápida divisão celular, como as células da medula óssea e da mucosa bucal, sem necessitar de cultura. As células bucais são a primeira barreira para inalação ou ingestão de substâncias tóxicas e são capazes de metabolizar carcinógenos em produtos reativos (Autrup *et al.*, 1985; Vondracek *et al.*, 2001). Aproximadamente 90% dos cânceres se originam de células epiteliais de diversos órgãos, podendo-se, então considerar as células epiteliais da mucosa oral como um alvo preferido para eventos genotóxicos induzidos por agentes carcinogênicos que entram no organismo via inalação ou ingestão (Holland *et al.*, 2008). O aparecimento dos MN nessas células está estimado em 5-7 dias. Entretanto, esse tempo pode aumentar para até 21 dias devido a variações interindividuais (Holland *et al.*, 2008).

Para verificar a formação de MN nas células da mucosa bucal, estas são coletadas e armazenadas em tubos contendo tampão específico, lavadas e coradas (Holland *et al.*, 2008). Muitos métodos de coloração têm sido usados, incluindo-se a coloração de Giemsa (2 – 10%) (Desai *et al.*, 1996; Hastak *et al.*, 1997; Bloching *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2006).

O epitélio oral contém as células basais, as quais possuem coloração nuclear homogênea e razão núcleo/citoplasma maior do que depois de sua diferenciação (Thomas *et al.*, 2008; Holland *et al.*, 2008). Vários tipos de anomalias nucleares podem ser avaliados nas células diferenciadas da mucosa bucal (Tolbert *et al.*, 1991). As células com MN são

caracterizadas pela presença de um núcleo principal e um menor chamado micronúcleo, de forma oval ou redonda, e com um diâmetro de 1/3 a 1/16 do diâmetro do núcleo principal. Sua presença indica perda ou fragmentação cromossômica que ocorreu durante a divisão nuclear prévia (Thomas *et al.*, 2008). Células com NBUDs são caracterizadas por uma aparente constrição nuclear. O *nuclear bud* tem a mesma morfologia e coloração do núcleo principal, entretanto possui um tamanho que varia de metade a um quarto, do núcleo principal. O mecanismo que leva à formação dessa morfologia está relacionado com a eliminação de DNA amplificado ou com mecanismos de reparo de DNA (Fenech & Crott, 2002).

Em alguns casos, podem ser observadas, na mucosa bucal, células binucleadas com dois núcleos muito próximos ou encostados. A significância dessas células não é totalmente conhecida, mas podem ser indicativas de falha na citocinese da última divisão celular (Thomas *et al.*, 2008). Células com cromatina condensada, cariorréticas, picnóticas e cariolíticas, indicativas de morte celular, também podem ser encontradas. As células com cromatina condensada indicam um estágio precoce de apoptose (Meireles *et al.*, 2006; Thomas *et al.*, 2008). As células cariorréticas são caracterizadas por uma agregação mais extensa de cromatina nuclear, que pode levar a eventual desintegração do núcleo. Esse tipo de célula pode estar passando por um estágio tardio de apoptose (Çelik *et al.*, 2003; Thomas *et al.*, 2008). As picnóticas são aquelas que possuem o núcleo pequeno (2/3 do núcleo de uma célula diferenciada normal) e com uma coloração mais escura que as normais, devido à alta densidade de material nuclear uniformemente distribuído. Nas cariolíticas, o núcleo está completamente depletado de DNA tornando-o impossível de ser visualizado. Provavelmente as células cariolíticas representam um estágio muito tardio de processo de morte celular (Çelik *et al.*, 2003; Thomas *et al.*, 2008).

2.4 Toxicidade das tintas e de seus principais compostos

Embora existam vários estudos acerca da toxicologia dos metais (para revisão, ver Beyersmann & Hartwig, 2008) e dos solventes orgânicos (Costa *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2008; Torres *et al.*, 2008), os danos causados pela exposição a tintas ainda é pouco estudado.

Os metais, presentes nos pigmentos, são, provavelmente, as toxinas mais antigas conhecidas. Diferente de outros compostos, os metais não são degradados por organismos vivos, e podem se acumular até níveis perigosos. O metal entra no organismo, normalmente, pelo trato gastrointestinal ou, dependendo das suas características e do tipo de exposição, via respiratória ou dérmica (Goyer & Clarkson, 2001).

Muitos estudos têm mostrado o envolvimento do estresse oxidativo e da genotoxicidade na ação tóxica de metais comumente encontrados nas tintas. O cobalto, usado como pigmento nas tintas, pode causar quebras simples no DNA e induzir micronúcleos em células de mamíferos (De Boeck *et al.*, 2003; Beyersmann & Hartwig, 2008) e em humanos (Mateuca *et al.*, 2005; Keegan, 2008). O dióxido de titânio mostrou-se um indutor de estresse oxidativo em células epiteliais brônquicas humanas (Gurr *et al.*, 2005) e agente genotóxico em peixes (Reeves *et al.*, 2008). Os íons Fe^{+2} estão associados à formação de radicais hidroxila através da reação de Fenton em linfócitos humanos (Jiménez & Vélez-Pardo, 2004). A exposição humana ao alumínio está envolvida com o desenvolvimento de fibrose pulmonar (Goyer & Clarkson, 2001), doença de Alzheimer (Santibáñez *et al.*, 2007), aumento do estresse oxidativo (Bulat *et al.*, 2008), indução de danos ao DNA em linfócitos humanos (Crebeli *et al.*, 2002; Banasik *et al.*, 2005; Lima *et al.*, 2007), no tecido nervoso de ratos (Kumar *et al.*, 2009) e em células de *Allium cepa* L. (Achary *et al.*, 2008). Além disso, o alumínio foi capaz de gerar espécies reativas de oxigênio em cérebro de ratos (Kumar *et al.*, 2009). O cromo III e o cromo VI podem induzir a formação de ligações cruzadas entre DNA e

proteínas (Medeiros *et al.*, 2003) e quebras duplas de DNA, em indivíduos expostos (Xie *et al.*, 2009), respectivamente. Trabalhadores expostos a mistura de metais, incluindo o cromo, tiveram aumento dos níveis de MDA e de danos no DNA (Liu *et al.*, 2009).

Embora a utilização do chumbo nas tintas tenha diminuído consideravelmente, este metal ainda é encontrado em algumas delas e pode induzir danos renais, ao sistema nervoso central, e anemia microcítica e hipocrômica (Goyer & Clarkson, 2001). O chumbo interfere na síntese do grupo heme da hemoglobina, por inibição ou diminuição da atividade de várias enzimas dessa rota metabólica. A enzima ácido delta-aminolevulínico desidratase é inibida e, como consequência, aumenta a concentração do seu substrato, o ácido delta-aminolevulínico (ALA) que é excretado na urina (Ahmed & Siddiqui, 2007). A dosagem de ALA na urina é usada como marcador de intoxicação por chumbo e reflete a exposição recente a esse metal. Além disso, o chumbo é capaz de induzir estresse oxidativo devido a: i) oxidação do ALA com geração de radicais $O_2^{\bullet-}$, radical HO^{\bullet} e de H_2O_2 (Gurer-Orham *et al.*, 2004); ii) capacidade de estimular íons ferrosos a iniciar a peroxidação lipídica de membranas celulares (Adonaylo *et al.*, 1999); e iii) inibição de enzimas antioxidantes como Sod e Cat (Ahmed & Siddiqui, 2007). Paralelamente, o chumbo pode inibir dois dos principais sistemas de reparo do DNA, o reparo por excisão de bases (BER) e o reparo por excisão de nucleotídeos (NER) (Hartwig, 1994; Beyersmann & Hartwig, 2008). Já foi relatado, ainda, que o chumbo induz quebras de cadeia e formação de sítios álcali-lábeis no DNA de trabalhadores expostos (Palus *et al.*, 2003) e em células endoteliais humanas (Gastaldo *et al.*, 2007) além do aumento do estresse oxidativo de trabalhadores ocupacionalmente expostos (Mohammad *et al.*, 2008).

Os solventes presentes nas tintas podem gerar sintomatologias diversas e danos oxidativos (Goyer & Clarkson, 2001; Costa *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2008). Entre os diferentes solventes orgânicos encontrados nas tintas, o tolueno é o mais utilizado. Este

composto pode depositar-se nos tecidos, principalmente, no sistema nervoso central. Manifestações de exposição ao tolueno abrangem desde tontura e dor de cabeça até depressão respiratória e morte. Uma parte do tolueno é exalada inalterada e outra parte é metabolizada, pelo complexo P450, em ácido benzóico e pequenas quantidades de *o*-cresol. A dosagem urinária de ácido hipúrico, resultante da conjugação entre ácido benzóico e glicina, tem sido utilizada como forma de monitorar a exposição ao tolueno (Duydu *et al.*, 1999; Heuser *et al.*, 2007).

Células renais de porcos tratadas com tolueno e xileno por 48h mostraram redução da viabilidade e aumento do conteúdo de MDA (Al-Ghamdi *et al.*, 2003). Por outro lado, mitocôndrias de placenta humana expostas simultaneamente ao tolueno e ao xileno tiveram os níveis de peroxidação lipídica diminuídos quando comparados com a exposição a cada um dos solventes isoladamente (Sawicka & Dlugosz, 2008). A exposição de derme humana a vapores de estireno, tolueno, acetona, xileno e percloroetileno (por 8 h) foi capaz de induzir danos oxidativos em lipídeos e proteínas (Costa *et al.*, 2006). O etileno glicol é capaz de provocar danos cardiopulmonares e renais (Egbert & Abraham, 1999) associados à geração de ER (Dlugosz *et al.*, 2005). Estudos em ratos expostos a acetato de n-butila mostraram que este solvente provoca irritação estomacal, sedação e hipoatividade neurológica (David *et al.*, 2001).

O tiner (constituído principalmente por tolueno), embora não faça parte da composição das tintas, é frequentemente utilizado pelos pintores para remoção de resíduos de tintas e, eventualmente, para diluição das tintas. Já foi demonstrado que a exposição de ratos ao tiner induziu a formação de espécies reativas de oxigênio e aumentou o conteúdo de MDA no córtex, hipocampo e cerebelo destes animais (Baydas *et al.*, 2005; Martínez-Alfaro *et al.*, 2006).

Resultados de estudos sobre a exposição humana a solventes orgânicos mostraram níveis aumentados de MDA e 4-hidroxinonenal, marcadores do estresse oxidativo, em trabalhadores expostos ao tiner (Halifeoglu *et al.*, 2000), ao estireno e etileno glicol (Dlugosz & Sawicka, 1998) e em trabalhadores de indústrias têxteis (Bayil *et al.*, 2008).

Os dados acerca da genotoxicidade dos solventes orgânicos ainda são contraditórios. A exposição ao tolueno, benzeno, etilbenzeno e xileno induziu um aumento de danos ao DNA em linfócitos humanos (Chen *et al.*, 2008). Além disso, a exposição ao tolueno aumentou a formação de micronúcleos em eritrócitos de camundongos (Mohtshampur *et al.*, 1985). Tolueno e benzeno foram hábeis em aumentar os danos no DNA em células pulmonares humanas (Pariselli *et al.*, 2009). A exposição da derme humana ao estireno, tolueno, acetona, xileno e percloroetileno também resultou em aumento de danos no DNA (Costa *et al.*, 2006). Por outro lado, demonstrou-se que tolueno, benzeno e acetona não foram capazes de alterar a frequência de micronúcleos em linfócitos humanos (Zarani *et al.*, 1999) e que células renais de porcos tratadas com tolueno e xileno não apresentaram aumento da fragmentação do DNA (Al-Ghamdi *et al.*, 2003).

Dados obtidos em trabalhadores expostos a solventes (tolueno, xileno, benzeno, acetona, acetato de etila) mostraram um aumento de danos ao DNA avaliados pelo ensaio cometa (Lam *et al.*, 2002; Heuser *et al.*, 2005; Marczyński *et al.*, 2005; Roma-Torres *et al.*, 2006; Heuser *et al.*, 2007; Pandey *et al.*, 2008; Torres *et al.*, 2008; Marczyński *et al.*, 2009) e pelo teste de micronúcleos, tanto em linfócitos (Pitarque, 2002; Çelik *et al.*, 2003; Roma-Torres *et al.*, 2006; Pandey *et al.*, 2008; Duan *et al.*, 2009) quanto em células da mucosa bucal (Karahalil, 1990; Burgaz *et al.*, 2002; Gonzáles-Yebra *et al.*, 2009), ao contrário do demonstrado por Heuser *et al.* (2005) e Heuser *et al.* (2007) em indivíduos ocupacionalmente expostos.

A exposição ocupacional a tintas foi capaz de induzir um aumento da peroxidação lipídica (Dlugosz & Sawicka, 1998; Karagözler *et al.*, 2002; Mohammad *et al.*, 2008) e diminuição da atividade da Sod sérica (Karagözler *et al.*, 2002) assim como diminuição da Sod e Cat eritrocitária (Mohammad *et al.*, 2008). Foi relatado também, indução de danos no DNA (Oesch *et al.*, 1994; Fuchs *et al.*, 1996; Zhu *et al.*, 2001; Martino-Roth *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2003) em trabalhadores expostos a tintas. Além disso, a literatura mostra aumento de micronúcleos, tanto em células da mucosa bucal (Diaz, 1990; Pinto *et al.*, 2000; Martino-Roth *et al.*, 2003) quanto em linfócitos (Diaz, 1990; Nise *et al.*, 1991; Di Giorgio *et al.*, 1994; Testa *et al.*, 2005; Aksoy *et al.*, 2006) em indivíduos ocupacionalmente expostos a tintas. Observou-se também aumento de aberrações cromossômicas em pintores (Piña-Calva, 1991; Silva & Santos-Mello, 1996; Pinto *et al.*, 2000; Gajalakshmi *et al.*, 2002; Testa *et al.*, 2005; Madhavi *et al.*, 2008). Em contraste, outro estudo mostrou que indivíduos expostos a tintas há no mínimo 6 meses, não apresentaram aumento de danos ao DNA (ensaio cometa) e nem aumento da frequência de micronúcleos em linfócitos (Cárdenas-Bustamante *et al.*, 2007).

Tendo em vista a diversidade de resultados obtidos em relação aos efeitos genotóxicos/mutagênicos em indivíduos expostos a tintas, o objetivo deste trabalho foi avaliar os marcadores de estresse oxidativo e os possíveis efeitos genotóxicos e mutagênicos em trabalhadores ocupacionalmente expostos a tintas. Tendo em vista, ainda, dados obtidos em nosso laboratório, mostrando que os danos no DNA de manipuladores de drogas antineoplásicas podem ser reparados durante o final de semana (Rombaldi *et al.*, 2009), este estudo avaliou os indivíduos expostos antes do início da jornada de trabalho (segunda-feira de manhã) e depois da exposição semanal (sexta-feira no final da tarde).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar os possíveis danos oxidativos, genotóxicos e/ou mutagênicos em indivíduos ocupacionalmente expostos a tintas.

3.2. Objetivos específicos

- Quantificar os níveis de estresse oxidativo (através dos produtos de reação do ácido tiobarbitúrico e de proteínas oxidativamente modificadas) em trabalhadores expostos a tintas.
- Determinar a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e catalase nestes indivíduos.
- Avaliar o dano ao DNA em sangue periférico (ensaio cometa) bem como a frequência de micronúcleos em linfócitos e nas células da mucosa bucal dos trabalhadores expostos a tintas.
- Determinar a concentração de ácido hipúrico e de ácido delta-aminolevulínico na urina dos trabalhadores expostos.
- Avaliar o efeito do descanso do fim de semana sobre os parâmetros estudados.
- Verificar o efeito da utilização de equipamentos de segurança pelos trabalhadores sobre os parâmetros avaliados.

4. RESULTADOS

Os resultados deste trabalho estão apresentados na forma de artigo que foi submetido à revista *Mutagenesis*.

Oxidative stress and genotoxicity in workers occupationally exposed to paints

Carina Cassini¹, Caroline Calloni ¹, Giovana Bortolini¹, Solange Cristina Garcia ², Marco Aurélio Dornelles³, João Antônio Pêgas Henriques¹, Bernardo Erdtmann¹, Mirian Salvador^{1,3,*}

¹Centro de Ciências Agrárias e Biológicas, Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil

²Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil

³Centro de Ciências da Saúde, Universidade de Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil

* To whom correspondence should be addressed. Universidade de Caxias do Sul, Laboratório de Estresse Oxidativo e Antioxidantes, R Francisco Getúlio Vargas, 1130, CEP 95070-560, Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil. Tel:+ 55 54 32182105; Fax: +55 54 32182149; Email: msalvado@ucs.br

Abstract

Paints are complex mixtures of solvents and metals that can induce health damages in workers exposed to them. The aim of the present work was to evaluate possible oxidative and genotoxic effects in peripheral blood and buccal cell samples collected from 33 workers exposed to paint and 29 non-exposed workers (controls) during an ordinary working week (Monday morning to Friday afternoon). Oxidative markers in plasma samples were assessed using thiobarbituric acid assay (TBARS), carbonylated proteins (CP), and superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activities. Hippuric acid (HA) and delta-aminolevulinic acid (ALA) in urine were determined as biomarkers of toluene and lead exposure, respectively. Genotoxicity was measured in blood cells through comet assay, and micronucleus (MN) frequencies in binucleated lymphocytes and epithelial buccal cells. The exposed group showed higher CP, HA and ALA levels (Friday samples), and lower SOD and CAT activities (Monday samples). DNA damage index (comet assay) was higher in the exposed group, both in Monday and Friday samples, compared to the control group. No differences were observed in MN frequency between the groups. However, the exposed group presented an increase in nuclear buds frequency in lymphocytes – a marker of gene amplification –, as well as an increase in condensed chromatin in the buccal cells (Friday samples), suggesting apoptosis induction. Furthermore, a decrease in the nuclear division index (Friday samples) was observed in the exposed group, indicating that paint exposure induces cytostatic effects in lymphocytes. The results suggest that individuals exposed to paints have an unbalanced redox metabolism and increased levels of DNA damage.

Keywords: paint exposure, comet assay, micronucleus, oxidative stress

Introduction

Paint workers are occupationally exposed to a variety of organic solvents, including aromatic hydrocarbons (mainly toluene), aliphatic hydrocarbons, ketones, alcohols and esters, and metals such as aluminum, titanium, cobalt, chromium and lead (1-3). Despite the fact that some of these compounds are not considered carcinogenic by the International Agency for Research on Cancer (IARC), a mixture of them or some individual metals can contribute to increase the risk of developing cancer (4,5), neurological symptoms (6), hearing loss (7), and hepatic (8) and respiratory (9) diseases. The exact mechanism of these damages is not fully understood, but it is known that occupational exposure to organic solvents (3,10-12) and some metals (13-15) can induce oxidative stress and DNA damages. On the other hand, the occupational exposure to paints is less studied. There are some reports about DNA damage induction by paint exposure (16-21). However, these data are still controversial (22), and it is not known if these damages could be related with the increased oxidative stress levels induced by paints.

A wide range of methods is currently being used for detecting early biological effects of DNA-damaging agents in occupational settings. The single cell gel electrophoresis or comet assay has been proven a sensitive method for investigating DNA damage in human biomonitoring. The comet assay detects strand breaks, alkali-labile sites, DNA crosslinking, and incomplete excision repair (23). These damages could be or not repaired (3). Another well-established cytogenetic technique to assess DNA damage in occupational exposure is the micronucleus (MN) test (24). This cytogenetic mutational test detects historical accumulation of mutagenic events and

does not require metaphasic cells. It is a valuable tool for studying the most important occupational and environmental hazards to public health (3).

A previous work from our group showed that, even using protective personal equipment (PPEs), workers handling anti-tumoral drugs presented genotoxic damages, which vary along the working week (25). Therefore, the aim of the present work was to evaluate oxidative stress markers and potential genotoxic effects in workers occupationally exposed to paints, before the working week (Monday morning) and after the weekly exposure (Friday evening). Plasma oxidative damages to lipids and proteins were analyzed using thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and carbonylated proteins (CP) assays, respectively, and through the activity of the antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT). Genotoxicity was evaluated in peripheral blood (comet assay) and in lymphocytes and exfoliated buccal cells (MN assay). Hippuric acid (HA), the main metabolite resulting from toluene exposure (Heuser et al., 2007), and urine delta-aminolevulinic acid (ALA), a marker for lead exposure (26), were also assayed.

Materials and Methods

Subjects

Sixty-two healthy individuals participated in the study. The exposed group consisted of 33 men occupationally exposed to paints – for at least 6 months – from Caxias do Sul, RS, Brazil. Twenty-nine males, non-exposed and matched by age with the exposed group, were chosen as the control group. All of them were non-smokers and were not under medication. A personal questionnaire about work and lifestyle was answered by all individuals. The study was approved by the Ethics Committee of the

Universidade de Caxias do Sul. In accordance with the Declaration of Helsinki, all subjects were advised about the procedure and they signed an informed consent prior to participation in the study.

Blood, buccal cells and urine sampling

Blood samples were obtained by venipuncture, using vacutainers with heparin as anticoagulant. Buccal cells were collected with small-headed toothbrushes by rotating them 20 times in a circular motion, starting from a central point, and gradually increasing in circumference to produce an outward spiral effect. Both cheeks were sampled. Urine samples were collected into a plastic container without preservatives. Blood and oral cells were taken on Monday early morning and on Friday evening. Urine samples were collected on Friday evening.

Biochemical assays

Oxidative lipid damages were measured spectrophotometrically by the concentration of the TBARS (27). Results were expressed as nmol/mL. The oxidative damage to proteins was assessed by determining carbonyl groups based on the reaction with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) (E. Merck), as previously described (28). Results were expressed as nmol/mg of protein. Superoxide dismutase activity was determined measuring the inhibition of the rate of auto-catalytic adrenochrome formation at 480 nm, in a reaction medium containing 1 mM adrenaline (pH 2.0) and 50 mM glycine (pH 10.2) (both from E. Merck), as described by Bannister and Calabrese (29). The reaction was conducted at 30 °C for 3 min. Results were expressed as units/g of protein. One unit was defined as the amount of enzyme that inhibits the rate of adrenochrome formation in 50%. Catalase activity was measured according to the method described by Aebi (30). The assay principle is based on determining the rate

of hydrogen peroxide decomposition (H_2O_2) (E. Merck) decomposition at 240 nm. The reaction was conducted at 30 °C for 1 min. Results were expressed as units/g of protein. One unit is defined as the amount of enzyme that decomposes 1 μmol H_2O_2 per minute at pH 7.4 and 30 °C. Total protein levels were measured by the Biuret method (Bioclin, K 031, Brazil) for spectrophotometric determination at 545 nm. Results were expressed as mg/dL of plasma. All of these oxidative stress markers were analyzed in plasma samples. HA quantification was performed in urine by high performance liquid chromatography (HPLC) with a K 2501 UV/VIS detector operated by Eurochrom 2000 software (Knauer, Berlin, Germany). The wavelength at 225 nm was chosen according to Laffon *et al.* (31). The chromatographic separation was achieved using a reversed-phase column Eurospher-100 150 mm x 4 mm with 5- μm particle size. The mobile phase consisted of a mixture of KH_2PO_4 25 mM in acetic acid 1% - acetonitrile (90:10, v/v) with pH 3.5. The flow rate was 0.8 mL/min, and the analyses were performed under ambient temperature. Total run time was 30 min. Results were expressed as g/g of creatinine. Analysis of urinary ALA was carried out spectrophotometrically through Ehrlich's reagent (26). Results were expressed as mg/g of creatinine. Creatinine concentration was measured by spectrophotometry, using a routine laboratory kit (Doles Reagentes, Goiânia, GO, Brazil).

DNA damage assays

Single cell gel electrophoresis or comet assay was performed to assess potential genotoxic effects in the exposed group. Blood samples were transported to the laboratory under refrigeration (10-20 °C) and processed as quickly as possible. A standard protocol was adopted for comet assay preparation and analysis (23). Slides were prepared by mixing 5 μL whole blood and 95 μL low melting point agarose (0.75%) (Pronadisa). The mixture was poured onto a frosted microscope slide coated

with normal melting point agarose (1.5%) (Agargen). After solidification, the coverslip was removed and the slides were placed in lysis solution [2.5 M NaCl, 100 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and 10 mM Tris, pH 10.0-10.5, with freshly added 1 mL Triton X-100 and 10% dimethyl sulfoxide, all from E. Merck] for a minimum 1h and a maximum of 5 days. Subsequently, the slides were incubated in freshly made alkaline buffer (300 mM NaOH and 1 mM EDTA, pH 12.6, both from E. Merck) for 10 min. The DNA was electrophoresed for 20 min at 25V (0.9V/cm) and 300 mA, and the buffer was neutralized with 0.4M Tris (pH 7.5). Finally, DNA was stained with silver nitrate, and the slides were coded for blind analysis. Negative and positive controls were used for each electrophoresis assay in order to ensure procedure reliability. For positive control, 50 µl whole blood was mixed with 13 µl methyl methanesulfonate (M4016/Sigma, St. Louis, MO) to 8×10^{-5} M final concentration. This mixture was incubated at 37 °C for 2h. Images of 100 randomly selected cells (50 cells from each of two replicated slides) were analyzed from each sample. The damages were visually scored according to tail size into five classes, from no tail (0) to maximal (4) long tail, resulting in a single DNA damage score for each subject and, consequently, for each study group. Therefore, a group damage index (DI) could range from 0 (all cells with no tail, 100 cells x 0) to 400 (all cells with maximally long tails, 100 cells x 4).

To assess possible mutagenic effects, micronuclei assay was performed in binucleated lymphocytes and buccal cells. Lymphocyte cultures were set up by adding 0.3 mL blood to 5 mL standard culture medium (Nutricell, Campinas, SP, Brazil). Two cultures per subject were established. The flasks were cultured at 37 °C for 44 h before adding 5 µg/mL of cytochalasin B (Sigma), and incubation was continued until reaching total time of 72 h. After incubation, lymphocytes were harvested by centrifugation at

800 rpm for 5 min and fixed in methanol : acetic acid (3:1), without hypotonic treatment, and dropped onto clean slides. Staining was done with Giemsa 5% (pH 6.7). One thousand binucleated lymphocytes per sampling were scored for the presence of MN, nucleoplasmic bridges (NPBs) and nuclear buds (NBUDs) with microscopy at a magnification of 200 – 1000 x, according to Fenech (24). Calculation of the nuclear division index (NDI) was made according to Fenech (24), following the formula:

$$\text{NDI} = (\text{M1} + 2\text{M2} + 3\text{M3} + 4\text{M4}) / \text{N}$$

where M1 – M4 represent the number of cells with 1 – 4 nuclei and N is the total number of viable cells scored.

For the MN assay in buccal cells, the heads of the brushes used to collect the samples were individually placed into separate tubes containing 20 mL of buccal cell buffer (BC, 0.01M Tris-HCl, 0.1M EDTA tetra sodium salt, 0.02M sodium chloride, all from E. Merck) at pH 7.0. Cells of both right and left cheeks were mixed and centrifuged for 10 min at 1500 rpm. The supernatant was removed and replaced with 10 mL of fresh BC buffer. Cells were spun and washed three more times. One sample was applied to clean microscope slides and fixed with methanol absolute. The slices were stained with Giemsa 5%. The criterion of scoring cells with MN and other anomalies was the same as described by Thomas *et al.* (32). We scored one thousand cells for each sampling. Results were expressed as the frequency of abnormal cells per 1000 cells.

Statistical analysis

Epidemiological features reported by workers were presented as mean plus standard deviation data. Oxidative and DNA damage results were submitted to normal distribution through Kolmogorov-Smirnov test. Most parameters studied did not have a

normal distribution and they were presented as median plus interquartile range. Comparisons between the control and exposed groups were performed using Mann-Whitney U-test. Wilcoxon test was used to compare Monday and Friday results. Relationships between variables were assessed with Spearman's correlation coefficient. SPSS version 12.0 (SPSS, Chicago, IL) was used in all statistical analyses.

Results

The main characteristics of the exposed group are shown in Table I. No difference between the age of the exposed (36.94 ± 11.69 years) and the control group (39.14 ± 7.53 years) was observed. The exposed group had been working with painting from 0.5 to 26 years with a daily paint exposure of 1 to 12 hours. None of the workers reported the use of complete personal protective equipment (e.g., mask, gloves, protective clothes and glasses), 39.4% of the workers reported to wear three PPEs (mask, gloves and protective clothes) and 60.6% of them reported the use of only one or two of the PPEs mentioned above. No differences were observed in relation to drinking and eating habits between the exposed and non-exposed groups (data not shown).

The exposed group did not show any significant increase in TBARS levels in relation to the control group (Table II). However, in the exposed group, lipid damages were higher in Friday samples than in Monday samples ($p = 0.032$; $z = -2.14$). Friday samples of the exposed group also presented higher levels of protein damages than the control group ($p = 0.015$; $z = -2.44$). In addition, it was observed that workers exposed to paints had lower SOD ($p = 0.003$; $z = -2.935$) and CAT ($p = 0.025$; $z = -2.582$) activities in Monday samples.

An important genotoxic effect (comet assay) was found in the exposed group

Table I Characterization of the exposed group (n=33)

Age (years)	
Mean \pm SD	36.94 \pm 11.69
Range	18 – 61
Average working time (years)	
Mean \pm SD	9.10 \pm 7.80
Range	0.50 – 26
Daily paint exposure time (hours)	
Mean \pm SD	5.60 \pm 3.09
Range	1 – 12
Use of individual protection equipment (PPE) (%)	
Use of mask, gloves and protective clothes	39.4%
Use of one or two of the PPE mentioned above	60.6 %

Table II Oxidative stress markers in Monday and Friday samples from the control (n=29) and exposed (n=33) groups.

	TBARS (nmol/mL)	Carbonylated proteins (nmol DNPH/mg proteins)	Superoxide dismutase (U SOD/g proteins)	Catalase (U CAT/mg proteins)
Control group				
Monday samples				
Median (IQR) [#]	5.46 (1.43)	12.27 (8.87)	3.39 (4.54)	1.97 (1.24)
Min - max	3.43 – 7.09	2.95 – 19.50	0.29 – 10.21	0.57 – 4.85
Friday samples				
Median (IQR)	5.88 (0.89)	6.81 (4.48) #	2.52 (2.99)	1.52 (0.81)
Min - max	3.73 – 6.91	3.18 – 13.64	0.72 – 8.81	0.00 – 3.27
Exposed group				
Monday samples				
Median (IQR)	5.15 (1.87)	9.09 (7.28)	1.36 (2.04) **	0.94 (1.74) **
Min - max	1.55 – 10.24	2.05 – 23.41	0.08 – 6.75	0 – 6.08
Friday samples				
Median (IQR)	5.76 (2.06) *	9.09 (3.01) **	1.68 (2.82)	1.71 (1.36)
Min - max	4.41 – 10.50	4.77 – 13.41	0.12 – 6.38	0.29 – 5.84

[#] Interquartile range

* Values statically different from Monday samples in the same group by Wilcoxon test; $p \leq 0.05$

**Values statically different from control group by Mann-Whitney U test; $p \leq 0.05$

both in Monday and Friday samples (an increase of about 2.20 times in the DNA index) in relation to the control group (Monday samples, $p = 0.000$, $z = -5.356$; Friday samples, $p = 0.000$; $z = -6.456$). In the exposed group, the DNA damage index in Friday samples was higher than in Monday samples ($p = 0.003$; $z = -2.983$) (Figure 1). DNA damage classes one (Monday samples, $p = 0.000$, $z = -4.806$; Friday samples, $p = 0.000$, $z = -5.927$) and two (Monday samples, $p = 0.000$, $z = -5.516$; Friday samples, $p = 0.000$, $z = -6.001$) in the exposed group were higher than those observed in the control group, which showed a higher frequency of undamaged DNA (Monday samples, $p = 0.000$, $z = -5.194$; Friday samples, $p = 0.000$, $z = -6.076$). The exposed group also presented a higher level of DNA damage class three in Friday samples ($p = 0.017$; $z = -2.393$) (Table III). None of the workers who wear three PPEs (mask, gloves and protective clothes) presented DNA damage class four in the comet assay (data not shown). A negative correlation between DNA damage index and SOD activity ($\rho = -0.400$; $p = 0.021$) was observed in the exposed group. Positive correlations between DNA damage index and age ($\rho = 0.481$; $p = 0.005$) and between DNA damage index and average working time ($\rho = 0.376$; $p = 0.031$) were also found (Friday samples).

According to Brazilian regulation (33), HA and ALA levels in the exposed group were within normal values (HA up to 1.5 g/g creatinine; ALA up to 4.5 mg/g creatinine). However, it is important to mention that both HA and ALA were higher in the exposed group (HA: $p = 0.010$, $z = -2.591$; ALA: $p = 0.000$, $z = -4.487$) (Table IV). A positive correlation was observed between HA concentration and time daily paint exposure ($\rho = 0.435$; $p = 0.013$).

No statistical difference was detected in lymphocytes (Table V) and buccal cells (Table VI) micronuclei frequency between the exposed and control groups. However,

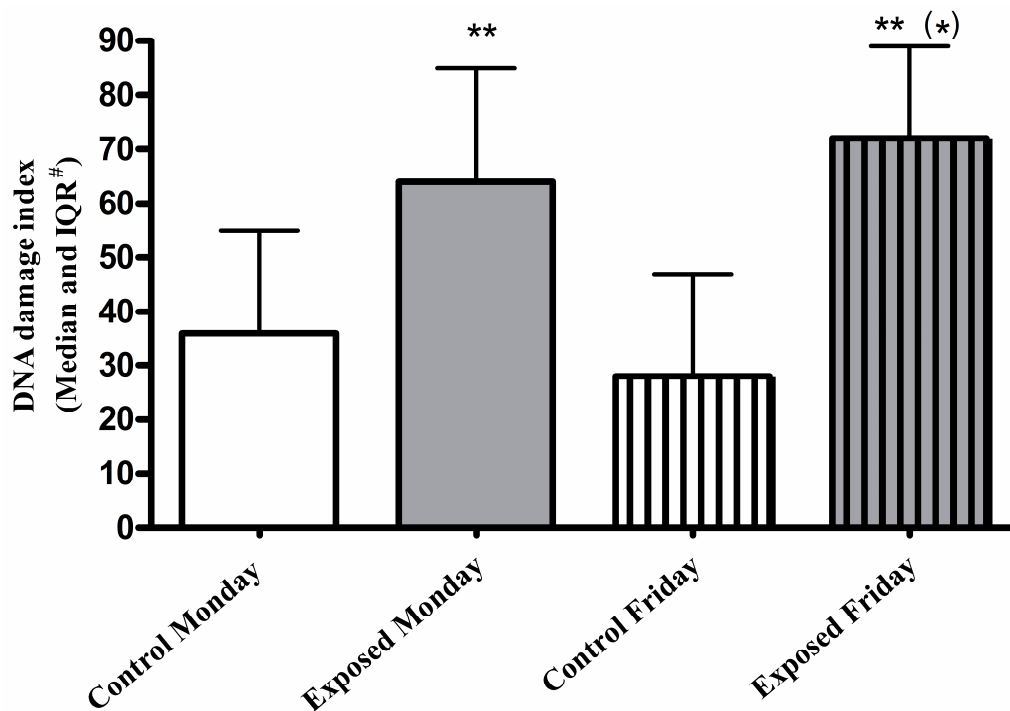


Fig.1. DNA damage index in control (n = 29) and exposed (n = 33) groups.

Interquartile range

** Values statically different from control group by Mann-Whitney U test, $p \leq 0.05$

* Values statically different from Monday samples in the same group by Wilcoxon test, $p \leq 0.05$

MN frequency (Monday samples) was higher ($p = 0.033$; $z = -2.165$) in individuals who work more than four hours/day (median 4.00; IQR 2.00) in comparison with painters that work less than 4 hours/day (median 2.00; IQR 1.00). Furthermore, an increase in NBUD (Monday samples, $p = 0.004$, $z = -2.894$) and a decrease in NDI (Friday samples, $p = 0.000$; $z = -4.78$) was observed in binucleated lymphocytes of the exposed group (Table V). Workers who wear three PPEs (mask, gloves and protective clothes) presented lower NBUDs frequency (median 2.00; IQR 2.00; $p = 0.046$; $z = -2.032$) than individuals who use only one or two PPEs (median 4.00; IQR 2.00). Buccal cells of the exposed group showed higher condensed chromatin cells frequency (Monday samples, $p = 0.000$, $z = -4.503$; Friday samples, $p = 0.000$, $z = -5.203$) (Table VI). Although no increase in MN frequency was observed, a positive correlation between MN frequency and daily exposure time was found (Monday samples, $\rho = 0.450$; $p = 0.018$).

Table III Frequency (%) of the different classes of DNA damage in Monday and Friday samples from the control (n=29) and exposed (n=33) groups.

	Undamaged cells	Damage class one	Damage class two	Damage class three	Damage class four
Control group					
Monday samples					
Median (IQR)#	64.00 (18.00)	35.00 (18.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)
Min - max	39.00 - 86.00	14.00 - 60.00	0.00 - 4.00	0.00 - 0.00	0.00 - 0.00
Friday samples					
Median (IQR)	72.00 (16.00)	28.00 (18.00)	0.0 (1.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)
Min - max	22.00 - 91.00	9.00 -78.00	0.00 - 3.00	0.00 - 0.00	0.00 - 0.00
Exposed group					
Monday samples					
Median (IQR)	41.00 (18.00)**	54.00 (15.00)**	3.00 (6.00)**	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)
Min - max	23.00 - 76.00	24.00 -74.00	0.00 - 17.00	0.00 - 8.00	0.00 - 4.00
Friday samples					
Median (IQR)	34.00 (15.00)** (*)	59.00 (11.00)** (*)	4.00 (7.00)**	0.00 (0.00)**	0.00 (0.00)
Min - max	15.00 - 63.00	36.00 - 81.00	0.00 - 15.00	0.00 - 9.00	0.00 - 1.00

Interquartile range

**Difference in relation to control group by Mann-Whitney test; $p < 0.05$

* Difference in relation to Monday samples in the same group by Wilcoxon test; $p < 0.05$.

The cells were assessed visually and received scores from 0 (undamaged) to 4 (maximally damaged), according to the size and shape of the tail (Heuser et al., 2007).

Table IV Hippuric acid and delta-aminolevulinic acid in control group (n = 29) and exposed group (n=33) in Friday samples.

	Hippuric acid (g/g creatinine)	Delta-aminolevulinic acid (mg/g creatinine)
Control group		
Median (IQR)#	0.22 (0.29)	0.68 (0.27)
Min - max	0.01 - 0.69	0.40 - 2.47
Exposed group		
Median (IQR)	0.38 (0.50) **	1.58 (1.34) **
Min - max	0.20 - 1.58	0.11 - 2.84

Interquartile range

**Values statically different from control group by Mann-Whitney U test, $p \leq 0.05$

Table V Micronucleus, nuclear buds and nucleoplasmic bridges frequencies and nuclear division index in lymphocytes in Monday and Friday samples from the control (n=29) and exposed (n=27) groups.

	Micronucleus /1000 binucleated cells	Nuclear bud /1000 binucleated cells	Nucleoplasmic bridges /1000 binucleated cells	Nuclear division index***
Control group				
Monday samples				
Median (IQR) [#]	3.00(1.00)	2.00 (2.00)	1.00 (2.00)	1.21 (0.12)
Min – max	1.00 -4.00	0.00 -4.00	0.00 -4.00	1.10 – 1.40
Friday samples				
Median (IQR)	3.00(2.00)	2.00 (2.00) *	1.00 (1.00)	2.02 (0.37) *
Min – max	0.00 – 6.00	0.00 -6.00	0.00 -3.00	1.10 – 2.37
Exposed group				
Monday samples				
Median (IQR)	3.00 (2.00)	3.00 (2.00) **	2.00 (3.00)	1.20 (1.10)
Min – max	1.00 – 5.00	0.00 – 7.00	0.00 – 7.00	1.10 – 2.19
Friday samples				
Median (IQR)	3.00 (2.00)	3.00 (3.00)	2.00 (2.00)	1.24 (0.54) **
Min – max	1.00 – 5.00	0.00 – 6.00	0.00 – 5.00	1.09 – 2.15

[#]Interquartile range

* Difference in relation to Monday samples in the same group by Wilcoxon test; p < 0.05

**Difference in relation to control group by Mann-Whitney test; p < 0.05

*** The nuclear division index (NDI) was calculated following the formula: $NDI = (M1 + 2M2 + 3M3 + 4M4) / 500$, where M1 – M4 represent the number of cells with 1 – 4 nuclei and N is the total number of viable cells scored.

Furthermore, the daily exposure time was positively correlated with NBUD frequency (Friday samples, $\rho = 0.402$; p= 0.038). Positive correlations between NBUD and NPB (Monday samples, $\rho = 0.605$, p = 0.001; Friday samples, $\rho = 0.480$, p = 0.011) were also observed.

Table VI Frequency of micronucleus, nuclear buds, binucleated, pyknotic, karyolytic, karyorrhetic and condensed chromatin cells in buccal cells in Monday and Friday samples from the control (n=29) and exposed (n=27) groups.

	Micronucleus /1000 cells	Nuclear bud /1000 cells	Binucleated cells /1000 cells	Pyknotic cells /1000 cells	Karyolytic cells /1000 cells	Karyorrhetic cells /1000 cells	Condensed chromatin cell /1000 cells
Monday samples							
Median (IQR) [#]	1.00 (1.00)	0.00 (0.00)	8.00 (8.00)	0.00 (1.00)	26.00 (18.00)	11.00 (9.00)	6.00 (7.00)
Min - max	0.00 - 4.00	0.00 - 2.00	3.00 - 31.00	0.00 - 6.00	5.00 - 62.00	0.00 - 54.00	0.00 - 18.00
Friday samples							
Median (IQR)	2.00 (2.00)	0.00 (1.00)	5.00 (6.00) *	1.00 (3.00)	37.00 (28.00) *	10.00(12.00)	1.00 (6.00)
Min - max	0.00 - 5.00	0.00 - 4.00	1.00 - 21.00	0.00 - 12.00	11.00 - 96.00	1.00 - 47.00	0.00 - 31.00
Monday samples							
Median (IQR)	2.00 (2.00)	0.00 (1.00)	9.00 (8.00)	0.00 (2.00)	17.00 (21.00)	8.00 (14.00)	15.00 (15.00) **
Min - max	0.00 - 4.00	0.00 - 2.00	0.00 - 22.00	0.00 - 5.00	10.00 - 79.00	0.00 - 31.00	1.00 - 47.00
Friday samples							
Median (IQR)	1.00 (1.00)	0.00 (0.00)	7.00 (7.00)	0.00 (1.00) *	34.00 (28.00) *	6.00 (7.00)	16.00 (17.00) **
Min - max	0.00 - 4.00	0.00 - 1.00	0.00 - 17.00	0.00 - 5.00	14.00 - 83.00	0.00 - 22.00	1.00 - 46.00

[#]Interquartile range

* Difference in relation to Monday samples by Wilcoxon test; p < 0.05

**Difference in relation to control group by Mann-Whitney test; p < 0.05

Discussion

Biological monitoring of exposure to deleterious chemicals is important in the evaluation of risks to human health and it is considered a strategy to improve conditions of occupational safety. In this sense, the present work evaluated possible toxic effects in individuals occupationally exposed to paints. Paints contain a heterogeneous group of chemicals that are difficult to classify because manufactures often fail to disclose the complete composition of their products. However, according to the paint labels, the workers studied were exposed, at least, to toluene, xylene, ethylbenzene, butyl and ethyl acetate, acetone, methyl isobutyl ketone, titanium, aluminum, lead, cobalt, and chromium. It is already known that these compounds can induce DNA damages (15,34-36) and an increase in oxidative stress levels (13,15,37,38). However, the effects induced by the mixture of them are still controversial.

Although we did not observe an increase in TBARS levels in the exposed group, Friday samples presented higher levels of TBARS than those observed in Monday samples, showing an increase in oxidative lipid damages during the week. Paint workers also presented an increase in oxidative protein damages in Friday samples (Table II). Although other studies are necessary, it seems that protein damages could be an oxidative stress biomarker more sensible than the detection of lipid damages. In fact, it has already been reported that exposure to organic solvents induces an increase in carbonylated protein levels in human skin (39). Moreover, it is possible that the interaction between toluene and xylene decreases the ability of these solvents to induce lipid peroxidation, probably due to the inhibition of their metabolism and/or to permeability alterations, as already described (40).

Antioxidant enzymes are important to counteract the damages induced by oxidative stress. The first line of enzymatic defense includes the action of SOD and CAT. SOD catalyzes the superoxide anion dismutation to H_2O_2 and CAT catalyzes the decomposition of H_2O_2 to water (41). In our work, we observed a decrease in SOD and CAT activities in the exposed group (Table II). It is known that both solvents and metals can generate reactive species (40,42,43), which could be partially detoxified by these enzymes, explaining the alterations in redox metabolism observed in the workers exposed to paints.

Organic solvents (3,12,44), metals (13-15) and paints (2,18,19) can also induce DNA damages. In fact, in the present work, an increase in DNA damages (comet assay) was observed in workers exposed to paints. In the exposed group, these damages were higher in Friday samples than in Monday samples (Figure 1), suggesting that the weekend is important to reduce, at least in part, the damages induced by paints.

On the other side, no increase was observed in micronucleus levels (Table V), showing that the DNA damages detected through comet assay were being repaired. Although many works have shown an increase in micronuclei frequency in painters (16,17,19-21), other works (22) already reported no differences in this cytogenetic parameter in workers exposed to paints, which agrees with our results. Furthermore, a study on human lymphocytes showed that some solvents found in paints (toluene, benzene and acetone) are unable to induce micronucleus formation (45).

Positive results in the comet assay do not always correspond to positive results in the MN tests, especially when the exposure to genotoxic agents is small. The comet assay usually detects more damages than the MN test (46). While MN assay detects injuries that survive at least one mitotic cycle, comet assay identifies reparable injuries

or alkali-label sites (3). Consequently, it is important to use both tests to get more reliable results (19).

Besides the detection of MN, this technique also allows checking other endpoints of genotoxin-exposed populations, such as NBUDs, NPBs and NDI. NBUDs are a biomarker of gene amplification, NPBs provide a measure of chromosome rearrangement, and the NDI index is biomarker of the proliferative status of the viable cell fraction (24). An increase in NBUDs frequency was observed in binucleated lymphocytes of the exposed group in Monday samples (Table V), suggesting chromosomal damage and/or a DNA instability status in this group (24). Shimizu *et al.* (47) showed that the amplified DNA of mammalian cells is selectively localized to specific sites at the periphery of the nucleus and eliminated via nuclear budding. However, the duration of the nuclear budding process and its extrusion from the cells remain unknown. The positive correlation between NBUD frequencies and daily exposure time (Friday samples; $\rho = 0.402$; $p = 0.018$) suggests that this abnormality could be induced by exposure to the complex mixture of compounds present in paints. In fact, an increase in NBUD frequency in workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons was already reported (11). A decrease in NDI in Friday samples was also found in the exposed workers (Table V), suggesting a potential cytostatic effect induced by paints and/or a delay in the cellular division process in order to better repair their DNA damages (48). This is the first work to explore this kind of nuclear abnormalities in painters, and the biological meaning of these findings should be better evaluated.

Among the different analytical procedures available, the biomonitoring assays using exfoliated cells from the buccal mucosa has shown its utility for the evaluation of genotoxic damage (49). It has been already suggested (50) that to study DNA damages

due to occupational exposure to toxic agents, it seems to be necessary to use both lymphocytes and buccal exfoliated cells. Besides evaluation of MN, exfoliated cells of mucosa also provide evidence of other nuclear abnormalities, such as NBUDs (small nucleus linked to the nucleus by a narrow or wide stalk of nucleoplasmic material), binucleated cells (presence of two nuclei within a cell), pyknotic cells (small shrunken nucleus with a high-density material), karyolytic cells (nuclear dissolution), karyorrhetic cells (nuclear fragmentation), and condensed chromatin cells (speckled or striated nuclear) (51). Binucleus formation is considered as an indicator of cytotoxicity, pyknotic cells are linked to cell death, karyorrhexis and karyolysis are considered as indicators of later apoptosis, while condensed chromatin is considered as an indicator of early stages of apoptosis (32). Although no increase in MN frequency was observed in the present work, the exposed group showed increased frequency in condensed chromatin in buccal cells (Table VI), suggesting the beginning of an apoptotic process (32), which could be related with reactive oxygen species generation and/or antioxidant depletion (41). It has already been shown that some solvents, such as benzene, are able to increase condensed chromatin frequency in exfoliated cells from the oral mucosa (52).

According to the Brazilian regulation (53), protective clothes, mask, gloves and glasses are PPEs that must be provided to the workers exposed to organic solvents. In this study, none of the workers declared to use complete PPEs, only 39.4% of them declared to wear three PPEs (protective clothes, masks and gloves), while 60.6% wore only one or two PPEs. This lack of appropriate use of PPEs together with a potential passive exposure could be associated, at least in part, to the molecular damages observed in this work.

The data presented herein shows that workers occupationally exposed to paints present DNA damages, as demonstrated through comet assay, as well as other abnormalities found in their DNA. The damages detected in the comet assay were repaired, since no alterations in MN levels were observed between both groups. However, the presence of DNA abnormalities should be better evaluated in order to establish their biological importance to the workers' health. Both comet and MN assays have shown to be very sensitive tests to measure DNA damages and they could be used to improve the monitoring of paint workers.

Founding

This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Acknowledgments

The authors thank all volunteers who participated in this study and the Corpo de Bombeiros of Caxias do Sul. The authors also thank Dr. Ana Cristina Andreazza (Universidade Federal do Rio Grande do Sul), Dr. Caroline Dani and MsC. Gustavo Scola (Universidade de Caxias do Sul) for their contributions.

Conflict of interest statement: none declared.

References

1. Pinto, D., Ceballos, J.M., García, G., Guzmán, P., Del Razo, L.M., Vera, E., Gómez, H., García, A. and Gonsébat, M.E. (2000) Increased cytogenetic damage in outdoor painters. *Mutat. Res.*, **467**,105-111.

2. Lee, K.-H., Ichiba, M., Zhang, J., Tomokuni, K., Hong, Y.-C., Ha, M., Know, H.J., Koh, S.-B., Choi, H.-R., Lee, K.-H., Park, C.-G., Cho, S.-H., Hirvonen, A., Strickland, P.T., Vermeulen, R., Hayes, R.B. and Kang, D. (2003) Multiple biomarkers study in painters in a shipyard in Korea. *Mutat. Res.*, **540**, 89-98.
3. Heuser, V.D., Erdtmann, B., Kvitko, K. and da Silva, J. (2007) Evaluation of genetic damage in Brazilian footwear-workers: biomarkers of exposure, effect, and susceptibility. *Toxicology*, **232**, 235-247.
4. International Agency for Research on Cancer [IARC] (2006) Inorganic and organic lead compounds. *Monograph on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans*, Vol. 87, IARC Press, Geneva.
5. Scélo, G., Metayer, C., Zhang, L., Wiemels, J.L., Aldrich, M.C., Selvin, S., Month, S., Smit, M.T. and Buffler, P.A. (2009) Household exposure to paint and petroleum solvents, chromosomal translocations, and the risk of childhood leukemia. *Environ. Health Perspec.*, **117**, 133-139.
6. Chen, R., Dick, F. and Seaton, A. (1999) Health effects of solvent exposure among dockyard painters: mortality and neuropsychological symptoms. *Occup. Environ. Med.*, **56**, 383-387.
7. Rabinowitz, P.M., Galusha, D., Slade, M.D., Dixon-Ernst, C., O'Neill, A., Fiellin, M. and Cullen, M.R. (2008) Organic solvent exposure and hearing loss in a cohort of aluminum workers. *Occup. Environ. Med.*, **65**, 230-235.
8. Kaukiainen, A., Vehmas, T., Rantala, K., Nurminen, M., Martikainen, R. and Taskinen, H. (2004) Results of common laboratory tests in solvent-exposed workers. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, **77**, 1432-1446.

9. Park, J., Lee, C.G., Ryu and S.Y. (2006) Factors related to the prevalence of respiratory symptoms in workers in a petrochemical complex. *J. Occup. Health*, **48**, 216-222.
10. Bayil, S., Cicek, H., Cimenci, I.G. and Hazar, M. (2008) How volatile organic compounds affect free radical and antioxidant enzyme activity in textile workers. *Arh. Hig. Rada. Toksikol.*, **59**, 283-287.
11. Duan, H., Leng, S., Pan, Z., Dai, Y., Niu, Y., Huang, C., Bin, P., Wang, Y., Liu, Q., Chen, W. and Zheng, Y. (2009) Biomarkers measured by cytokinesis-block micronucleus cytome assay for evaluating genetic damages induced by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutat. Res.*, **677**, 93-99.
12. Marczynski, B., Pesch, B., Wilhelm, M., Rossbach, B., Preuss, R., Hahn, J.-U., Rabstein, S., Raulf-Heimsoth, M., Seidel, A., Rihs, H.-P., Adams, A., Sherenberg, M., Erkes, A., Engelhardt, B., Straif, K., KäVerlein, H.U., Angerer, J. and Brüning, T. (2009) Occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage by industry: a nationwide study in Germany. *Arch. Toxicol.*, **83**, 947-957.
13. Mateuca, R., Aka, P.V., De Boeck, M., Hauspie, R. and Kirsch-Volders, M. (2005) Influence of *hOGG1*, *XRCC1* and *XRCC3* genotypes on biomarkers of genotoxicity in workers exposed to cobalt or hard metals dusts. *Toxicol. Lett.*, **156**, 277-288.
14. Mohammad, I.K., Mahdi, A.A., Raviraja, A., Najmul, I., Iqbal, A. and Thuppil, V. (2008) Oxidative stress in painters exposed to low lead levels. *Arh. Hig. Rada. Toksikol.*, **59**, 161-169.
15. Liu, H.H., Lin, M.H., Liu, P.C., Chan, C.I. and Chen, H.L. (2009) Health risk assessment by measuring plasma malondialdehyde (MDA), urinary 8-

hydroxydeoxyguanosine (8-OH-dG) and DNA strand breakage following metal exposure in foundry workers. *J. Hazard. Mater.*, **170**, 699-704.

16. Diaz, S., Fonseca, G. and Fernandes, I. (1990) Analysis of lymphocyte and oral mucosa cell micronuclei in Cuban paint industry workers. *Hereditas*, **113**, 77-80.

17. Nise, G., Högstedt, B., Bratt, I. and Skerfving, S. (1991) Cytogenetic effects in rotogravure printers exposed to toluene (and benzene). *Mutat. Res.*, **261**, 217 -223.

18. Zhu, C.Q., Lam, T.H. and Jiang, C.Q. (2001) Lymphocyte DNA damage in bus manufacturing workers. *Mutat. Res.*, **491**, 173-181.

19. Martino-Roth, M.G., Viégas, J. and Roth, D.M. (2003) Occupational genotoxicity risk evaluation through the comet assay and the micronucleus test. *Genet. Mol. Res.*, **2**, 410-417.

20. Testa, A., Festa, F., Ranaldi, R., Giachelia, M., Tirindelli, D., De Marco, A., Owczarek, M., Guidotti, M. and Cozzi, R. (2005) A multi-biomarker analysis of DNA damage in automobile painters. *Environ. Mol. Mutagen.*, **46**, 182-188.

21. Aksoy, H., Yilmaz, S., Çelik, M., Yüzbaşıoğlu, D. and Ünal, F. (2006) Genotoxicity study in lymphocytes of offset printing workers. *J. Appl. Toxicol.*, **26**, 10-15.

22. Cárdenas-Bustamante, O., Varona-Uribe, M., Patiño-Florez, R.I., Groot-Restrepo, H., Sicard-Suarez, D., Tórrez-Carvajal, M.M. and Pardo-Pardo, D. (2007) Exposición a solventes orgánicos y efectos genotóxicos en trabajadores de fábricas de pinturas de Bogotá. *Rev. Salud Pública*, **9**, 275-288.

23. Collins, A.R. (2004) The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol. Biotechnol.*, **26**, 249-261.

24. Fenech, M. (2007) Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat. Protoc.*, **2**, 1084-1104.
25. Rombaldi, F., Cassini, C., Salvador, M., Saffi, J. and Erdtmann, B. (2009) Occupational risk assessment of genotoxicity and oxidative stress in workers handling anti-neoplastic drugs during a working week. *Mutagenesis.*, **24**, 1-6 .
26. Tomokuni, K. and Ogata, M. (1972) Simple method for determination of urinary d-aminolevulinic acid as an index of lead exposure. *Clin. Chem.*, **18**, 1531-1536.
27. Wills, E.D. (1966) Mechanism of lipid peroxide formation in animal tissues. *Biochem. J.*, **99**, 667–676.
28. Levine, R.L., Garland, D., Oliver, C.N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A.-G., Ahn, B.-W., Shaltel, S. and Stadtman, E.R. (1990) Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods. Enzymol.*, **186**, 464-478.
29. Bannister, J.V. and Calabrese, L. (1987) Assays for SOD. *Methods. Biochem. Anal.*, **32**, 279-312.
30. Aebi, H. (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol.*, **105**, 121-126.
31. Laffon, B., Lema, M. and Méndez, J. (2001) Simultaneous high-performance liquid chromatographic determination of urinary and phenylglyoxylic acids as indirect evaluation of styrene exposure. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.*, **753**, 385–393.
32. Thomas, P., Sarah, H., Gruner, T. and Fenech, M. (2008) The buccal cytome and micronucleus frequency is substantially altered in Down’s syndrome and normal ageing compared to young healthy controls. *Mutat. Res.*, **638**, 37-47.

33. Ministério do Trabalho (1994) *Norma Regulamentadora NR 7 Programa de controle médico de saúde ocupacional*, Portaria SSST nº24, Brasília (DF).
34. Gurr, J.R., Wang, A.S., Chen, C.H. and Jan, K.Y. (2005) Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells. *Toxicology*, **213**, 66-73.
35. Keegan, G.M., Learmonth, I.D. and Case, C.P. (2008) A systematic comparison of the actual, potential, and theoretical health effects of cobalt and chromium exposures from industry and surgical implants. *Crit. Rev. Toxicol.*, **38**, 645-674.
36. Bulat, P., Potkonjak, B. and Dujic, I. (2008) Lipid peroxidation and antioxidante enzyme activity in erythrocytes of workers occupationally exposed to aluminum. *Arh. Hig. Rada. Toksikol.*, **59**, 81-87.
37. Reeves, J.F., Davies, S.J., Dodd, N.J. and Jha, A.N. (2008) Hydroxyl radicals ($\bullet\text{OH}$) are associated with titanium dioxide (TiO_2) nanoparticle- induced cytotoxicity and oxidative DNA damage in fish cells. *Mutat. Res.*, **640**, 113-12.
38. Torres, C.H., Varona, M.E., Lancheros, A., Patiño, R.I. and Groot, H. (2008) DNA damage assessment and biological monitoring of occupational exposure to organic solvents. *Biomedica*, **28**, 126-138.
39. Costa, C., De Pasquale, R., Silvari, V., Barbaro, M. and Catania, S. (2006) In vitro evaluation of oxidative damage from organic solvent vapours on human skin. *Toxicol. In Vitro*, **20**, 324-331.

40. Sawicka, E. and Dlugosz, A. (2008) Toluene and p-xylene mixture exerts antagonistic effect on lipid peroxidation in vitro. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health*, **21**, 201-209.
41. Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (2007) *Free Radicals in Biology*, 4th revised edn. Oxford Univ Press/ New York.
42. Valko, M., Morris, H. and Cronin, M.T.D. (2005) Metals, toxicity and oxidative stress. *Current Med. Chem.*, **12**, 1161-1208.
43. Revilla, A., Pestana, C.R., Pardo-Andreu, G.L., Santos, A.C., Uyemura, S.A., Gonzales, M.E. and Curti, C. (2007) Potential toxicity of toluene and xylene evoked by mitochondrial uncoupling. *Toxicol. In Vitro*, **21**, 782-788.
44. Roma-Torres, J., Teixeira, J.P., Silva, S., Laffon, B., Cunha, L.M., Méndez, J. and Mayan, O. (2006) Evaluation of genotoxicity in a group of workers from a petroleum refinery aromatic plant. *Mutat. Res.*, **604**, 19-27.
45. Zarani, F., Papazafiri, P. and Kappas, A. (1999) Induction of micronuclei in human lymphocytes by organic solvents in vitro. *J. Environ. Path. Toxicol. Oncol.*, **18**, 21-28.
46. Goethem, F.V. (1997) Comparative evaluation of the in vitro micronucleus test and the alkaline single cell gel electrophoresis assay for the detection of DNA damaging agents: genotoxic effects of cobalt powder, tungsten carbide and cobalt-tungsten carbide. *Mutat. Res.*, **392**, 31-43.

47. Schimizu, N., Shimuara, T. and Tanaka, T. (2000) Selective elimination of acentric double minutes from cancer cells through the extrusion of micronuclei. *Mutat. Res.*, **448**, 81-90.
48. Kirsch-Volders, M. and Fenech, M. (2001) Inclusion of micronuclei in non-divided mononuclear lymphocytes and necrosis/apoptosis may provide a more comprehensive cytokinesis block micronucleus assay for biomonitoring purposes. *Mutagenesis*, **16**, 51-58.
49. Pelclova, D., Cerna, M. and Pastorkova, A. (2000) Study of the genotoxicity of toluene. *Arch. Environ. Health*, **55**, 268-272.
50. Faust, F., Kassie, F., Knasmüller, S., Kevekordes, S. and Mersch-Sundermann, V. (2004) Use of primary blood cells for the assessment of exposure to occupational genotoxicants in human biomonitoring studies. *Toxicology*, **198**, 341-350.
51. Tolbert, P.E., Shy, C.M. and Allen, J.W. (1992) Micronuclei and other nuclear abnormalities in buccal smears: methods and development. *Mutat. Res.*, **271**, 69-77.
52. Meireles, J.R.C., Lopes, M.A., Alves, N.N. and Cerqueira, E. de M.M. (2006) Apoptosis in exfoliated cells from the oral mucosa of individuals occupationally exposed to mutagenic and carcinogenic agents. *Rev. Bras. Cancerol.*, **52**, 337 – 343.
53. Ministério do Trabalho (2001) *Norma Regulamentadora NR 6 Equipamento de proteção individual*, Portaria SIT nº25, Brasília (DF).

5. DISCUSSÃO GERAL

Neste trabalho foram avaliados 33 indivíduos expostos a tintas há, no mínimo 6 meses, e 29 indivíduos não expostos, que constituíram o grupo controle. De acordo com as informações obtidas no questionário de saúde ocupacional (Anexo 3), todos os participantes do estudo eram saudáveis, não fumantes e mantinham uma alimentação equilibrada, rica em todas as classes de nutrientes. Salienta-se, ainda, que os hábitos de ingestão de bebidas alcoólicas não diferiram entre os grupos controle e exposto (dados não mostrados). Foi eliminada, portanto, a interferência do cigarro e do álcool, e minimizada a influência de diferentes hábitos alimentares nos resultados desse estudo. Além disso, nenhum dos participantes do estudo informou ter parentes próximos com qualquer desordem genética ou filho nascido prematuramente ou abortado.

Comercialmente, as tintas podem ser classificadas como industriais, automotivas e decorativas, principalmente em função das suas propriedades de dureza, flexibilidade, resistência e tempo de secagem. Entretanto, não é possível estabelecer diferenças específicas na composição dos diferentes tipos de tintas. Neste estudo, os indivíduos estiveram ocupacionalmente expostos a tintas industriais, automotivas e decorativas. De acordo com as informações constantes nos boletins técnicos, as tintas utilizadas pelos trabalhadores deste estudo continham: xileno, tolueno, etilbenzeno, metil isobutil cetona, acetona, acetato de etila e butila, butanol, isopropanol, titânio, alumínio,

chumbo, cobalto, zinco, cromo e resinas à base de poliéster, acrílicas, alquídicas e/ou poliuretânicas. Não foi observada nenhuma correlação entre os efeitos biológicos encontrados nos indivíduos expostos e a composição das tintas. Isto se deve, provavelmente, à complexidade das misturas utilizadas e a não especificação de todos os compostos presentes em cada tinta.

Já está descrito que o tolueno, o xileno e o etilbenzeno podem induzir danos oxidativos ao DNA em linfócitos humanos (Chen *et al.*, 2008). A exposição ocupacional a diferentes misturas de solventes orgânicos foi capaz de aumentar a peroxidação lipídica (Halifeoglu *et al.*, 2000; Bayil *et al.*, 2008) e de induzir danos ao DNA (Heuser *et al.*, 2005; Roma-Torres *et al.*, 2006; Heuser *et al.*, 2007; Torre *et al.*, 2008). Além disso, a exposição à mistura de tolueno e outros solventes orgânicos produziu um aumento da frequência de micronúcleos tanto em linfócitos (Pitarque *et al.*, 2002; Roma-Torres *et al.*, 2006) quanto em células da mucosa bucal (Karahalil, 1990; Çelik *et al.*, 2003; Gonzáles-Yebra *et al.*, 2009) de indivíduos expostos.

Além dos solventes, metais como: alumínio, chumbo, cromo, cobalto e titânio também podem causar danos ao DNA. O alumínio foi genotóxico (Crebeli *et al.*, 2002; Banasik *et al.*, 2005; Lima *et al.*, 2007) e induziu estresse oxidativo (Bulat *et al.*, 2008) em humanos. O chumbo, amplamente estudado, induziu quebras simples e duplas de DNA e formação de sítios álcali-lábeis em indivíduos ocupacionalmente expostos (Palus *et al.*, 2003). Este metal também pode inibir o sistema de reparo de danos ao DNA por excisão de bases e o reparo por excisão de nucleotídeos (Hartwig, 1994; Beyersmann & Hartwig, 2008). Tanto o cromo III quanto o VI estão associados a alterações no DNA (ligações cruzadas DNA-proteínas e formação de quebras duplas) em indivíduos expostos (Medeiros *et al.*, 2003; Xie *et al.*, 2009) além de aumento dos níveis de MDA (Liu *et al.*, 2009). O cobalto pode causar quebras simples no DNA (De

Boeck *et al.*, 2003; Beyersmann & Hartwig, 2008) em células de mamíferos. O titânio induziu estresse oxidativo em células epiteliais brônquicas humanas (Gurr *et al.*, 2005) e foi genotóxico em peixes (Reeves *et al.*, 2008).

Nesse trabalho, observou-se um aumento significativo dos danos no DNA (ensaio cometa) nos trabalhadores expostos a tintas, tanto nas amostras coletadas na segunda quanto nas de sexta-feira (Figura 1). Esses resultados corroboram outros achados da literatura (Oesch *et al.*, 1994; Fuchs *et al.*, 1996; Zhu *et al.*, 2001, Martino-Roth *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2003). Embora este ensaio não permita identificar o composto causador de dano, é possível que os solventes e/ou metais presentes nas tintas sejam os responsáveis pelo efeito biológico observado. O ensaio cometa, na sua versão alcalina, detecta danos do tipo quebras simples e duplas, sítios álcali-lábeis e ligações cruzadas (Tice *et al.*, 2000), as quais podem ser reparadas pelos sistemas de reparo por excisão de bases, reparo por excisão de nucleotídeos, recombinação homóloga, recombinação não homóloga e síntese de DNA translesão (Moustachi, 2000; Saffi & Henriques, 2003; Natarajan & Palitti, 2008). Danos oxidativos nas bases purínicas e/ou pirimidínicas do DNA são reparados pelo sistema BER (Hazra *et al.*, 2007; Dizdaroglu *et al.*, 2008), enquanto que distorções estruturais do DNA ativam o NER. Quebras duplas são reparadas pela recombinação não-homóloga ou homóloga (Wyman & Kanaar, 2006; Pardo *et al.*, 2009).

Considerando que não foi observado aumento da formação de micronúcleos nos linfócitos (Tabela 5) e nas células da mucosa bucal (Tabela 6) dos indivíduos expostos, aparentemente os danos ao DNA verificados pelo ensaio cometa foram reparados. Cabe salientar, entretanto, que foi observado um aumento na frequência de NBUDs (Tabela 5) nos linfócitos dos indivíduos expostos, indicando a ocorrência de amplificação gênica - expansão do número de cópias de um gene - a qual pode estar relacionada à

iniciação da carcinogênese (Fenech, 2006). Foi relatado, recentemente, aumento de NBUDs em trabalhadores expostos a hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (Duan *et al.*, 2009). No presente trabalho, observou-se uma correlação positiva entre a frequência de formação de NBUDs e o tempo diário de exposição a tintas nas amostras coletadas na sexta-feira ($p = 0,402$; $p = 0,018$), sugerindo a participação das tintas e/ou de seus componentes nas alterações celulares encontradas.

Além disso, observou-se, nos trabalhadores expostos a tintas, uma diminuição do índice de divisão nuclear nos linfócitos periféricos em comparação com o grupo controle (Tabela 5). Na presença de lesões genotóxicas, as células podem tolerar o dano e sobreviver; ativar as vias de morte por apoptose ou necrose; ou parar o ciclo celular para reparar o dano (Kirsch-Volders & Fenech, 2001). É possível que os danos ao DNA detectados pelo ensaio cometa tenham sido reparados (já que não houve aumento na formação de micronúcleos nos indivíduos expostos) e, em função disso, tenha sido observada uma diminuição do IDN.

Também foi observado um aumento da frequência de células com cromatina condensada nas células da mucosa bucal dos trabalhadores expostos (Tabela 6), indicativo de estágios precoces de apoptose (Holland *et al.*, 2008), o que já foi relatado na literatura (Meireles *et al.*, 2006). As células da mucosa bucal são bastante suscetíveis aos efeitos dos solventes voláteis e dos metais (Kleinsasser *et al.*, 2000), os quais podem ser responsáveis, ao menos em parte, pelos efeitos observados. A capacidade de reparo de lesões ao DNA das células da mucosa bucal é menor do que a capacidade de reparo dos linfócitos (Dhillon *et al.*, 2004), provavelmente devido ao alto índice de divisão celular e conseqüente encurtamento de vida que as células da mucosa bucal apresentam. A menor capacidade de reparo e a exposição a agentes que sabidamente induzem danos

ao DNA, podem explicar o aumento do marcador de morte celular (cromatina condensada), encontrado nas células da mucosa bucal dos trabalhadores expostos a tintas nesse estudo.

Além da indução de danos ao DNA, os solventes (Costa *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2008; Torres *et al.*, 2008), os metais (Valko *et al.*, 2005) e a exposição ocupacional a tintas (Dlugosz & Sawicka, 1998; Karagözler *et al.*, 2002; Mohammed *et al.*, 2008) também estão associados à geração de estresse oxidativo. Curiosamente, em nosso trabalho, não foi observado aumento no índice de danos aos lipídeos (TBARS) nos indivíduos expostos, embora o nível de peroxidação lipídica tenha se mostrado mais elevado na coleta de sexta-feira, quando comparado com a coleta de segunda-feira (Tabela 2). Além disso, alterações na atividade das enzimas antioxidantes Sod e Cat também foram encontradas (Tabela 2), sugerindo que existe um desequilíbrio no metabolismo redox, que para os lipídeos, parece estar sendo compensado. Já, em relação às proteínas, observou-se um aumento no índice de danos no grupo exposto (coleta da sexta-feira; Tabela 2), sugerindo que este pode ser um marcador mais sensível para danos oxidativos do que os lipídeos.

Este é o primeiro trabalho que mostra danos oxidativos a proteínas em indivíduos ocupacionalmente expostos a tintas. No entanto, já foi demonstrado aumento de danos a proteínas (proteínas carboniladas) em células de derme humana expostas a vapores de tolueno, xileno e/ou acetona (Costa *et al.*, 2006). Em relação à indução de danos oxidativos aos lipídeos, os resultados ainda são controversos. Embora a exposição ocupacional a tintas tenha sido capaz de induzir aumento da peroxidação lipídica (Dlugosz & Sawicka, 1998; Karagözler *et al.*, 2002; Mohammed *et al.*, 2008), misturas de solventes podem resultar numa diminuição de danos oxidativos a lipídeos (em

relação à exposição aos solventes de forma isolada), como já relatado para o tolueno e xileno, em mitocôndrias isoladas de placenta humana (Sawicka & Dlugosz, 2008). Embora ainda não seja conhecida a razão deste efeito biológico, é possível que a competição entre os solventes pelos sítios ativos da enzima CYP2E1, responsável pelo metabolismo destes solventes, possa diminuir a concentração de metabólitos capazes de gerar lesões oxidativas (Sawicka & Dlugosz, 2008).

Tanto os solventes quanto os metais presentes nas tintas podem gerar diversas ER (Valko *et al.*, 2005; Dlugosz *et al.*, 2005; Revilla *et al.*, 2007; Sawicka & Dlugosz, 2008). A diminuição da atividade da enzima antioxidante Sod, observada em nosso trabalho, sugere a geração do radical superóxido pelas tintas e/ou seus componentes. A diminuição da atividade da Cat nos indivíduos expostos pode ser devida a dismutação do peróxido de hidrogênio produzido pela Sod ou gerado pelos compostos presentes nas tintas. Além disso, parte do radical superóxido pode ter reagido com óxido nítrico, formando peroxinitrito (Halliwell & Guteridge, 2007), e produzindo os danos oxidativos às proteínas observados neste trabalho. Outra explicação para o aumento de danos a proteínas pode ser a reação do radical superóxido com centros Fe-S de proteínas e consequente liberação do íon Fe^{+2} , o qual pode ter gerado o radical hidroxila pela reação de Fenton. Este radical, por não ter nenhuma enzima específica para sua detoxificação, é extremamente lesivo, podendo causar, inclusive, danos ao DNA (Halliwell & Guteridge, 2007).

Ao contrário do esperado, nenhum dos indivíduos expostos utilizava todos os equipamentos de segurança (óculos, roupas para proteção do corpo, luvas e máscara específicas) determinados pela Norma Regulamentadora - NR6 do Ministério do Trabalho e Emprego (1978). Apenas 39,4% dos trabalhadores estudados utilizavam três EPIs (roupas de proteção, luvas e máscara). Os restantes declararam utilizar apenas um

ou dois dos equipamentos de segurança fornecidos pelas empresas (Tabela 1). Além disso, a maior parte dos indivíduos entrevistados informou que usava EPIs somente no momento da pintura, retirando-os logo após o procedimento. Considerando que, em grande parte dos locais de trabalho visitados, havia mais de um indivíduo trabalhando com tintas simultaneamente e em espaços reduzidos, existe, ainda, a possibilidade de contaminação pela exposição passiva a tintas. Esses dados podem explicar, ao menos em parte, o aumento de danos ao DNA observado nos indivíduos expostos. Nesse sentido, observou-se que os indivíduos expostos que utilizavam apenas um ou dois EPIs apresentaram dano ao DNA classe quatro, e uma maior incidência na formação de *nuclear bud* em seus linfócitos, o que não foi observado para os indivíduos que utilizavam os 3 EPIs.

O presente trabalho também teve a finalidade de avaliar o efeito do descanso do final de semana sobre os parâmetros avaliados. Os níveis de danos no DNA (Figura 1) e nos lipídeos (Tabela 2) apresentaram-se significativamente mais baixos na coleta de segunda-feira (em relação à da sexta-feira) no grupo exposto. É possível inferir, portanto, que o descanso do final de semana é importante para a diminuição dos danos no DNA e lipídeos dos indivíduos expostos.

Em resumo, esse trabalho mostrou que a exposição ocupacional a tintas induz danos ao DNA (ensaio cometa) e um desequilíbrio no metabolismo redox, evidenciado pelo aumento de proteínas carboniladas e alterações nas atividades da Sod e Cat. Embora os danos ao DNA observados nos indivíduos expostos desse estudo estejam sendo reparados, salienta-se a importância do uso correto dos equipamentos de proteção individual e do monitoramento constante. Neste sentido, a inclusão de marcadores de genotoxicidade, como o ensaio cometa e micronúcleos, poderia colaborar com o monitoramento biológico dos indivíduos ocupacionalmente expostos a tintas.

6. CONCLUSÕES

Os dados obtidos nesse trabalho permitem concluir que:

1. Os indivíduos ocupacionalmente expostos a tintas apresentaram um maior índice de danos oxidativos a proteínas (proteínas carboniladas) nas amostras coletadas na sexta-feira quando comparados ao grupo controle. Por outro lado, não foi observado um aumento na incidência de danos aos lipídeos (TBARS) no grupo exposto.
2. Observou-se uma diminuição na atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e catalase nos indivíduos expostos nas coletas realizadas na segunda-feira.
3. Embora os níveis de ácido hipúrico e ALA tenham se mostrado mais elevados nos indivíduos expostos do que no grupo controle, esses valores estão dentro da faixa de normalidade determinada pela Norma Regulamentadora NR-7, do Ministério do Trabalho e Emprego.
4. Os indivíduos ocupacionalmente expostos apresentaram um aumento significativo de danos ao DNA (ensaio cometa), principalmente classes um e

dois, tanto nas amostras coletadas na segunda quanto nas de sexta-feira. Observou-se uma correlação positiva entre o índice de danos ao DNA (coleta de sexta-feira) com o tempo total de exposição a tintas ($\rho = 0,376$, $p = 0,031$) dos trabalhadores.

5. Não foi observado aumento na incidência de micronúcleos em linfócitos ou em células da mucosa bucal dos indivíduos expostos. No entanto, verificou-se uma maior incidência na formação de *nuclear bud* (em linfócitos) e de células com cromatina condensada (mucosa bucal) nestes indivíduos.

6. A frequência de *nuclear buds* foi significativamente maior nos indivíduos expostos a tintas que utilizavam apenas um ou dois EPIs, quando comparada aos que usavam que três EPIs (luvas, máscaras e roupas de proteção). Além disso, o uso de três EPIs preveniu o dano ao DNA classe quatro (amostras coletadas na sexta-feira).

7. PERSPECTIVAS

Como continuidade deste trabalho, seria importante:

1. Avaliar os níveis de xileno, etilbenzeno, isobutilmetilcetona, acetona, cobalto, cromo, alumínio e titânio presente nas tintas assim como os seus respectivos marcadores urinários, em trabalhadores expostos a tintas.
2. Avaliar, em indivíduos expostos a tintas, os polimorfismos dos genes das principais enzimas relacionadas ao metabolismo de xenobióticos, como as CYP 1A1 e CYP2E1 (metabolismo fase I) e GSTM1, GSTP1 e GSTT1 (metabolismo fase II).
3. Quantificar os antioxidantes enzimáticos (glutaciona peroxidase e peroxirredoxinas) e não enzimáticos (glutaciona, beta-caroteno, ácido ascórbico, alfa-tocoferol) no grupo exposto.
4. Realizar o ensaio cometa tratando os linfócitos com a enzima formamidopirimidina DNA glicosilase e endonuclease II, a fim de detectar

possíveis danos oxidativos nas bases purínicas e pirimidínicas, respectivamente, nessas células.

5. Avaliar a expressão de marcadores de apoptose como as caspases 8 e 9 e clivagem da poli-ADP ribose polimerase, a fim verificar um possível efeito dos compostos presentes nas tintas, nestas cascatas de sinalização celular.

6. Avaliar o estresse oxidativo, a genotoxicidade e a mutagenicidade em trabalhadores expostos a tintas após um período prolongado de afastamento das tintas (final do período de férias).

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Achary, V.M.M.; Jena, S.; Panda, K.K.; Panda, B.B. (2008). Aluminium induced oxidative stress and DNA damage in root cells of *Allium cepa* L. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 70(2): 300-310.
- Adonaylo, V.N.; Oteiza, P.L. (1999). Pb²⁺ promotes lipid peroxidation and alteration in membrane physical properties. **Toxicology** 132: 19-32.
- Aebi, H. (1984) Catalase in vitro. **Methods. Enzymol.** 105:121-126.
- Ahamed, M. & Siddiqui, M.K.J. (2007). Low level lead exposure and oxidative stress: current opinions. **Clin. Chim. Acta.** 383: 57-64.
- Aksoy, H.; Yilmaz, S.; Çelik, M.; Yüzbaşıoğlu, D.; Ünal, F. (2006). Genotoxicity study in lymphocytes of offset printing workers. **J. Applied Toxicol.** 26: 10-15.
- Al-Ghamdi, S.S.; Raftery, M.J.; Yaqoob, M.M. (2003). Acute solvent exposure induced activation of cytochrome P4502E1 causes proximal tubular cell necrosis by oxidative stress. **Toxicol. in Vitro** 17: 335-341.

- Autrup, H.; Seremet, D.; Arenholt, L.; Dragsted, A. (1985). Metabolism of benzo[a]pyrene by cultured rat and human buccal mucosa cells. **Carcinogenesis** 6: 1761-1765.
- Banasik, A.; Lankoff, A.; Piskulak, A.; Adamowska, K.; Lisowska, H.; Wojcik, A. (2005). Aluminum-induced micronuclei and apoptosis in human peripheral-blood lymphocytes treated during different phases of the cell cycle. **Environ. Toxicol.** 20(4): 402-206.
- Bannister, J.V. & Calabrese, L. (1987). Assays for Sod. **Methods Biochem. Anal.** 32:279-312.
- Bardin-Mikolajczak, A.; Lissowska, J.; Zaridze, D.; Szeszenia-Dabrowska, N.; Rudnai, P.; Fabianova, E.; Mates, D.; Navratilova, M.; Bencko, V.; Janout, V.; Fevotte, J.; Fletcher, T.; Manneje, A.; Brennan, P.; Boffeta, P. (2007) Occupational and risk of lung cancer in Central an Eastern Europe: the IARC multi-center case-control study. **Cancer Causes Control** 18 (6): 645 – 654.
- Baute, J. & Depicker, A. (2008). A base excision repair and its role in maintaining genome stability. **Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.** 43: 239-276.
- Baydas, G.; Ozveren F.; Tuzcu, M.; Yasar, A. (2005). Effects of thinner exposure on the expression pattern of neural cell adhesion molecules, level of lipid peroxidation in the brain and cognitive function in rats. **Eur. J. Pharmacol.** 512: 181-187.
- Bayil, S.; Cicek, H.; Cimenci, I.G.; Hazar, M. (2008). How volatile organic compounds affect free radical and antioxidant enzyme activity in textile workers. **Arh. Hig. Rada. Toksikol.** 59: 283-287.

- Beyersmann, D. & Hartwig (2008). Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms. **Arch. Toxicol.** 82(8): 493-512.
- Bloching, M.; Hofmann, A.; Lautenschlager, C.; Berghaus, A.; Grummt, T. (2000). Exfoliative cytology of normal buccal mucosa to predict the relative risk of cancer in the upper aerodigestive tract using MN-assay. **Oral. Oncol.** 36: 550-555.
- Boffeta, P.; Jourenkova, N.; Gustavsson, P. (1997). Cancer risk from occupational and environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. **Cancer Causes Control** 8 (3): 444 – 472.
- Bonnefoy, M.; Draï, J. & Kostka, T. (2002). Antioxidants to slow aging, facts and perspectives. **Presse. Med.** 31(25):1174-84.
- Brukner, J.V. & Warren, D.A. (2001) Toxic effects of solvents and vapors. In: Klaassen, C.D. **Casarett and Doull's Toxicology: The basic science of poisons.** 6th ed., McGraw-Hill: New York, 1236p.
- Bulat, P.; Potkonjak, B.; Dujic, I. (2008). Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activity in erythrocytes of workers occupationally exposed to aluminum. **Arh. Hig. Rada Toksikol.** 59(2): 81-87.
- Burgaz, S.; Erdem, O.; Cakmak, G.; Erdem, N.; Karakaya, A.; Karakaya, A.E. (2002). Cytogenetic analysis of buccal cells from shoe-workers and pathology and anatomy laboratory workers exposed to n-hexane, toluene, methyl ethyl ketone and formaldehyde. **Biomarkers** 7(2): 151-161.

- Cárdenas-Bustamante, O.; Varona-Urbe, M.; Patiño-Florez, R.I.; Groot-Restrepo, H.; Sicard-Suarez, D.; Tórrez-Carvajal, M.M.; Pardo-Pardo, D. (2007). Exposición a solventes orgánicos y efectos genotóxicos em trabajadores de fábricas de pinturas de Bogotá. **Rev. Salud. Publica** 9(2):275-288.
- Çelik, A.; Çavas, T.; Ergene-Gözükara, S. (2003) Cytogenetic biomonitoring in petrol station attendants: micronucleus test in exfoliated buccal cells. **Mutagenesis** 18(5): 417-421.
- Chakravarti, B. & Chakravarti, D.N. (2007). Oxidative modification of proteins: age-related changes. **Gerontology** 53: 128-139.
- Chang, T.Y.; Wang, V.S.; Hwang, B.F.; Yen, H.Y.; Lai, J.S.; Liu, C.S.; Lin, S.Y. (2009). Effects of co-exposure to noise and mixture of organic solvents on blood pressure. **J. Occup. Health** 51(4): 332-339.
- Chen, C.; Arjomandi, M.; Qin, H.; Balmes, J.; Tager, I.; Holland, N. (2006). Cytogenetic damage in buccal epithelia and peripheral lymphocytes of yuong healthy individuals exposed to ozone. **Mutagenesis** 21: 131-137.
- Chen, C.; Hseu, Y.C.; Liang, S.H.; Kuo, J.H.; Chen, S.C. (2008). Assessment of genotoxicity of methyl-tert-butyl ether, benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene to human lymphocytes using comet assay. **J. Hazar. Mater.** 153: 351-356.
- Chen, R.; Dick, F.; Seaton, A. (1999). Health effects of solvent exposure among dockyard painters: mortality and neuropsychological symptoms. **Occup. Environ. Med.** 56: 383 – 387.

- Collins, A.R.; Oscoz, A.A.; Brunborg, G.; Gaivão, I.; Giovannelli, L.; Kruszewski, M.; Smith, C.C.; Stetina, R. (2008). The comet assay: topic issues. **Mutagenesis** 23: 143-151.
- Contijo, A.M.M., Tice, R. (2003). Teste do cometa para detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. In: Ribeiro, L.R., Salvadori, D.M.F., Marques, E.K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Editora da ULBRA..
- Costa, C.; De Pasquale, R.; Silvari, V.; Barbaro, M.; Catania, S. (2006). In vitro evaluation of oxidative damage from organic solvent vapours on human skin. **Toxicol. in Vitro** 20:324-331.
- Crebeli, R.; Carta, P.; Andreoli, C.; Aru, G.; Dobrowolny, G.; Rossi, S.; Zijno, A. (2002). Biomonitoring of primary aluminium industry workers: detection of micronuclei and repairable DNA lesions by alkaline SCGE. **Mutat. Res.** 516 (1-2): 63-70.
- David, R.M.; Tyler, T.R.; Ouellete, R.; Faber, W.D.; Banton, M.I. (2001). Evaluation of subchronic toxicity of n-butyl acetate vapor. **Food Chem. Toxicol.** 39:877-886.
- De Boeck, M.; Lombaert, N.; de Backer, S.; Finsy, R.; Lison, D.; Kirsch-Volders, M. (2003). In vitro effects of different combinations of cobalt and metallic carbide particles. **Mutagenesis** 18: 177-186.
- Denicola, A. & Radi, R. (2005). Peroxynitrite and drug-depending toxicity. **Toxicology** 208: 273-288.

- Desai, S.S.; Ghaisas, S.D.; Jakhi, S.D.; Bhide, S.V. (1996). Cytogenetic damage in exfoliated oral mucosal cells and circulating lymphocytes of patients suffering from precancerous oral lesions. **Cancer Lett.** 109: 9-14.
- Dhilon, V.S.; Thomas, P.; Fenech, M. (2004). Comparison of DNA damage and repair following radiation challenge in buccal cells and lymphocytes using single-cell gel electrophoresis. **Int. J. Radiat. Biol.** 80 (7): 517 – 528.
- Di Giorgio, C.; De Méo, M.P.; Laget, M.; Guiraud, H.; Botta, A.; Duménil, G. (1994). The micronucleus assay in human lymphocytes: screening for inter-individual variability and application to biomonitoring. **Carcinogenesis** 15(2):313-317.
- Diaz, S.; Fonseca, G.; Fernandes, I. (1990). Analysis of lymphocyte and oral mucosa cell micronuclei in Cuban paint industry workers. **Hereditas** 113(1): 77-80.
- Dizdaroglu, M.; Kirkali, G.; Jaruga, P. (2008). Formamidopyrimidines in DNA: mechanisms of formation, repair, and biological effects. **Free Radic. Biol. Med.** 45(12): 1610-1621.
- Dlugosz, A. & Sawicka, E. (1998). Chemoprotective effect of coenzyme Q on lipids in the paint and laquer industry workers. **Int. J. Occup. Med. Environ. Health** 11(2): 153-163.
- Dlugosz, A.; Sawicka, E.; Marchewka, Z. (2005). Styrene and ethylene glycol have a synergetic effect on lipid peroxidation that is better protected than repaired by CoW₁₀. **Toxicol. in Vitro** 19:581-588.
- Duan, H.; Leng, S.; Pan, Z.; Dai, Y.; Niu, Y.; Huang, C.; Bin, P.; Wang, Y.; Liu, Q.; Chen, W.; Zheng, Y. (2009). Biomarkers measured by cytokinesis-block

- micronucleus cytome assay for evaluating genetic damages induced by polycyclic aromatic hydrocarbons. **Mutat. Res.** 677: 93-99.
- Duydu, S.Y.; Süzen, N.; Erden, H.; Uysal, H.; Vural, N. (1999) Validation of hipuric acid as a biomarker of toluene exposure. **Bull. Env. Contam.Toxicol.** 63:1-8.
- Egbert, P.A. & Abraham, K. (1999) Ethylene glycol intoxication: Pathophysiology, diagnosis, and emergency management. **ANNA J.** 26:295-302.
- Erdtmann, B. (2003). A Genotoxicidade nossa de todos os dias. In: Silva, J da; Erdtmann, B., Henriques, JAP. **Genética Toxicológica.** 1a. ed., Alcance: Porto Alegre, 424p.
- Esterbauer, H. & Cheeseman, K.H. (1990). Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods Enzymol.** 186:407-21.
- Fazenda, J.M.R (1995) **Tintas e Vernizes: Ciência e Tecnologia/ 2ªed.**, ABRAFATI São Paulo, 1064 p.
- Fenech, M. & Crott, J.W. (2002). Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes-evidence for breakage-fusion-bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay. **Mutat. Res.** 504: 131-136.
- Fenech, M. (2000) The in vitro micronucleus technique. **Mutat. Res.** 455: 81 – 95.
- Fenech, M. (2006) Cytokinesis-block micronucleus assay involves into a “cytome” assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. **Mutat. Res.** 600: 58-66.

- Fenech, M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nat. Protoc.** 2(5): 1084-1104.
- Fridovich, I. (1998). Oxygen toxicity: a radical explanation. **J. Exp. Biol.** 201:1203-1209.
- Fuchs, J.; Hengstler, J.G.; Hummrich, F.; Oesch, F. (1996). Transient increase in DNA strand breaks in car refinishing spray painters. **Scand. J. Work Environ. Health** 22(6): 438-443.
- Gajalakshmi, P.; Balasundaram, A.; Vekatesan, P.; Santhiya, S.T.; Ramesh, A. (2002). Cytogenetic studies on spray painters in south India. **Mutat. Res.** 514 (1-2): 1-6.
- Gastaldo, J.; Viau, M.; Bencokova, Z.; Joubert, A.; Charvet, A.M.; Balosso, J.; Foray, N. (2007). Lead contamination results in late and slowly repairable DNA double-strand breaks and impacts upon the ATM-dependent signaling pathways. **Toxicol. Lett.** 173: 201-214.
- González-Yebra, A.L.; Kornhauser, C.; Barbosa-Sabanero, G.; Pérez-Luque, E.L.; Wrobel, K. (2009). Exposure to organic solvents and cytogenetic damage in exfoliated cells of the buccal mucosa from shoe workers. **Int. Arch. Occup. Environ. Health** 82:373-380.
- Góth, L. (1991). Serum catalase: reversibly formed charged isoform of erythrocyte catalase. **Clin. Chem.** 37 (12): 2043 -2047.
- Goyer, R.A. & Clarkson, T.W. (2001) Toxic effects of metals. In: Klaassen, C.D. **Casarett and Doull's Toxicology: The basic science of poisons.** 6th ed., McGraw-Hill: New York, 1236p.

- Griffiths, A.J.F.; Miller, J.H.; Suzuki, D.T.; Lwontin, R.C.; Gelbart, W.M. (2002).
Mutaçao gênica. In: Griffiths, AJF; Miller, JH; Suzuki, DT; Lwontin, RC; Gelbart,
WM. **Introdução à genética**. 7a. edição., Guanabara-Koogan: Rio de Janeiro,
794p.
- Gurer-Orhan, H.; Sabir, H.U.; Ozgunes, H. (2004). Correlation between clinical
indicator of lead poisoning and oxidative stress parameters in controls and lead
exposed workers. **Toxicology** 195: 147-154.
- Gurr, J.R.; Wang, A.S.; Chen, C.H.; Jan, K.Y. (2005). Ultrafine titanium dioxide
particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human
bronchial epithelial cells. **Toxicology** 213 (1-2): 66-73.
- Halifeoglu, I.; Canatan, H.; Ustundag, B.; Ilhan, N.; Inanc, F. (2000). Effect of thinner
inhalation on lipid peroxidation and some antioxidant enzymes of people working
with paint thinner. **Cell Biochem. Funct.** 18(4):263-7.
- Halliwell, B. & Gutteridge, J.M.C. (2007). **Free Radicals in Biology And Medicine**. 4th
ed. Oxford Univ Press: New York, United States, 851p.
- Hanawalt, P.C. & Spivak, G. (2008). Transcription-coupled DNA repair: two decades of
progress and surprises. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** 9: 958-970.
- Hartmann, A., Speit, G. (1994). Genotoxic effects of chemicals in the single cell gel
(SCG) test with human blood cells in relation to the induction of sister-chromatid
exchanges (SCE). **Mutat. Res.** 346: 49-56.
- Hartwig, A. (1994). Role of DNA repair inhibition in lead- and cadmium- induced
genotoxicity: a review. **Environ. Health Perspect.** 102 (suppl 3): 45-50.

- Hastak, K.; Lubri, N.; Jakhi, S.D., More, C.; John, A.; Ghaisas, S.D.; Bhide, S.V. (1997). Effect of turmeric oil and turmeric oleoresin on cytogenetic damage in patients suffering from oral submucous fibrosis. **Cancer Lett.** 116: 265-269.
- Hazra, T.K.; Das, A.; Das, S.; Choudhury, S.; Kow, Y.W.; Roy, R. (2007). Oxidative DNA damage repair in mammalian cells: a new perspective. **DNA Repair** 6(4): 470-480.
- Heddle, J.A. (1973). A rapid in vivo test for chromosome damage. **Mutat. Res.** 18: 187-192.
- Heuser, V.D.; de Andrade, V.M.; da Silva, J.; Erdtmann, B. (2005). Comparison of genetic damage in Brazilian footwear-workers exposed to solvent-based and water-based adhesive. **Mutat. Res.** 583 (1): 85-94.
- Heuser, V.D.; Erdtmann, B.; Kvitko, K.; da Silva, J. (2007). Evaluation of genetic damage in Brazilian footwear-workers: biomarkers of exposure, effect, and susceptibility. **Toxicology** 232: 235-247.
- Holland, N.; Bolognesi, C.; Kirsch-Volders, M.; Bonassi, S.; Zeiger, E.; Knasmueller, S.; Fenech, M. (2008) The micronucleus assay in human buccal cells as a tool biomonitoring DNA damage: the HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. **Mutat. Res.** 659 (1-2): 93-108.
- Houtgraaf, J.H.; Versmissen, J.; Giessen, W.J. Van Der (2006). A concise review of DNA damage checkpoints and repair in mammalian cells. **Cardiovasc. Resusc. Med.** 7: 165-172.

International Agency for Research on Cancer IARC (2006). **Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans**. 1-25.

Jiménez, D.R.M. & Vélez-Pardo, C. (2004). Transition metal-induced apoptosis in lymphocytes via hydroxyl radical generation, mitochondria dysfunction, and caspase-3 activation: an in vitro model for neurodegeneration. **Arch. Med. Res.** 35(3): 185-193.

Karagözler, A.A.; Mehmet, N.; Batcioglu, K. (2002). Effects of long-term solvent exposure on blood cytokine levels and antioxidant enzyme activities in house painters. **J. Toxicol. Environ. Health** 65(17):1237-46.

Karahalil, B.; Karakaya, A.E.K.; Burgaz, S. (1999). The micronucleus assay in exfoliated buccal cells: application to occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons **Mutat. Res.** 442(1):29-35.

Kaukiainen, A.; Vehmas, T.; Rantala, K.; Nurminen, M.; Martikainen, R.; Taskinen, H. (2004). Results of common laboratory tests in solvent-exposed workers. **Int. Arch. Occup. Environ. Health** 77(1): 1432-1446.

Keegan, G.M.; Learmonth, I.D.; Case, C.P. (2008). A systematic comparison of the actual, potential, and theoretical health effects of cobalt and chromium exposures from industry and surgical implants. **Crit. Rev. Toxicol.** 38(8): 645 -674.

Kirsch-Volders, M. & Fenech, M. (2001). Inclusion of micronuclei in non-divided mononuclear lymphocytes and necrosis/apoptosis may provide a more comprehensive cytokinesis block micronucleus assay for biomonitoring purposes. **Mutagenesis** 16(1): 51-58.

- Kleinasser, N.H.; Wallner, B.C.; Kastenbauer, E.R.; Muenzenrieder, R.K.; Harréus, U.A. (2000). Comparing the genotoxic sensitivities of human peripheral blood lymphocytes and mucosa cells of the upper aerodigestive tract using the Comet assay. **Mutat. Res.** 467: 21-30.
- Kumar, V.; Bal, A.; Gill, K. (2009). Aluminium-induced oxidative DNA damage recognition and cell-cycle disruption in different regions of rat brain. **Toxicology** 264 (3): 137 -144.
- Lam, T.H.; Zhu, C.Q.; Jiang, C.Q. (2002). Lymphocyte DNA damage in elevator manufacturing workers in Guagzhou, China. **Mutat. Res.** 515 (1-2): 147-157.
- Lambourne, R. (1999) Solvents, thinners, and diluents. In: Lambourne, R. & Strivens, T.A. **Paint and surface coating: Theory and practice.** 2th ed.; WPWilliam Andrwe publishing: Cambridge, England, 784p.
- Lee, K.H.; Ichiba, M.; Zhang, J.; Tomokuni, K.; Hong, Y.C.; Ha, M.; Know, H.J.; Koh, S.B.; Choi, H.R.; Lee, K.H.; Park, C.G.; Cho, S.H.; Hirvonen, A.; Strickland, P.T.; Vermeulen, R.; Hayes, R.B.; Kang, D. (2003). Multiple biomarkers study in painters in a shipyard in Korea. **Mutat. Res.** 540: 89 – 98.
- Levine, R.L.; Garland, D.; Oliver, C.N.; Amici, A.; Climent, I.; Lenz, A.G.; Ahn, B.W.; Shaltel, S.; Stadtman, E.R. (1990). Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods Enzymol.** 186: 464 – 478.
- Lima, P.D.; Leite, D.S.; Vasconcellos, M.C.; Cavalcanti, B.C., Santos, R.A.; Costa-Lotuf, L.V.; Pessoa, C.; Moraes, M.O.; Burbano, R.R. (2007). Genotoxic effects

of aluminum chloride in cultured human lymphocytes treated in different phases of cell cycle. **Food. Chem. Toxicol.** 45 (7): 1154-1159.

Liu, H.H.; Lin, M.H.; Liu, P.C.; Chan, C.I.; Chen, H.L. (2009) Health risk assessment by measuring plasma malondialdehyde (MDA), urinary 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OH-dG) and DNA strand breakage following metal exposure in foundry workers. **J. Hazard. Mater.** 170(2-3):699-704.

Luch, A. (2005) Nature and nurture – lessons from chemical carcinogenesis. **Nat. Rev. Cancer.** 5: 113-125.

Madhavi, D.; Devi, K.R.; Sowjanya, B.L. (2008). Increased frequency of chromosomal aberrations in industrial painters exposed to lead-based paints. **J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.** 27(1): 53-59.

Maluf, S. & Erdtmann, B. (2003) Biomonitorização do dano genético em humanos. In: Da Silva, J; Erdtmann, B; Henriques, JAP. **Genética Toxicológica**, 1ª. Ed, Alcance, Porto Alegre, 424 p.

Marczynski, B.; Merget, R.; Mensing, T.; Rabstein, S.; Kappler, M.; Bracht, A.; Haufs, M.G.; Käfferlein, U.; Brüning, T. (2005). DNA strand breaks in the lymphocytes of workers exposed to diisocyanates: indications of individual differences in susceptibility after low-dose and short-term exposure. **Arch. Toxicol.** 79:355-362.

Marczynski, B.; Pesch, B.; Wilhelm, M.; Rossbach, B.; Preuss, R.; Hahn, J-U.; Rabstein, S.; Raulf-Heimsoth, M.; Seidel, A.; Rihs, H-P.; Adams, A.; Sherenberg, M.; Erkes, A.; Engelhardt, B.; Straif, K.; KäVerlein, H.U.; Angerer, J.; Brüning, T.

- (2009). Occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage by industry: a nationwide study in Germany. **Arch. Toxicol.** 83: 947-957.
- Martínez-Alfaro, M.; Palma-Tirado, L.; Sandoval-Zapata, F.; Cárabez-Trejo, A. (2006). Correlation between formamidopyrimidine DNA glycosylase (Fpg)-sensitive sites determined by a comet assay, increased MDA, and decreased glutathione during long exposure to thinner inhalation. **Toxicol. Lett.** 163: 198 – 205.
- Martino-Roth, M.G.; Viégas, J.; Roth, D.M. (2003). Occupational genotoxicity risk evaluation through the comet assay and the micronucleus test. **Genet. Mol. Res.** 2(4):410-417.
- Mateuca, R.; Aka, P.V.; De Boeck, M.; Hauspie, R.; Kirsch-Volders, M. (2005). Influence of *hOGG1*, *XRCC1* and *XRCC3* genotypes on biomarkers of genotoxicity in workers exposed to cobalt or hard metals dusts. **Toxicol. Lett.** 156: 277-288.
- Medeiros, M.G.; Rodrigues, A.S.; Batoreu, M.C.; Laires, A.; Rueff, J.; Zhitkovich, A. (2003). Elevated levels of DNA-proteins cross-links as a biomarker of exposures experienced by welders. **J. Toxicol. Environ. Health** 40: 217-222.
- Meireles, J.R.C.; Lopes, M.A.; Alves, N.N.; Cerqueira, E de M.M. (2006). Apoptosis in exfoliated cells from the oral mucosa of individuals occupationally exposed to mutagenic and carcinogenic agents. **Rev. Bras. Cancerol.** 52 (4): 337 – 343.
- Ministério do Trabalho (1978). Norma Regulamentadora NR 6. **Portaria N° 3.214**, Brasília (DF), 1p.

- Mohammad, I.K.; Mahdi, A.A.; Raviraja, A.; Najmul, I.; Iqbal, A.; Thuppil, V. (2008). Oxidative stress in painters exposed to low lead levels. **Arh. Hig. Rada. Toksikol.** 59 (3): 161-169.
- Mohtashampur E., Norpoth K., Woelke U., Huber P. (1985). Effects of ethylbenzene, toluene, and xylene on the induction of micronuclei in bone marrow polychromatic erythrocytes of mice. **Arch. Toxicol.** 58 (2): 106-109.
- Moustacchi, E. (2000). DNA damage and repair: consequences on dose-responses. **Mutat. Res.** 464: 35-40.
- Natarajan A.; Palitti, F. (2008). DNA repair and chromosomal alterations. **Mutat. Res.** 657: 3 – 7.
- Nise, G.; Högstedt, B.; Bratt, I.; Skerfving, S. (1991). Cytogenetic effects in rotogravure printers exposed to toluene (and benzene). **Mutat. Res.** 261 (3): 217 -223.
- Oesch, F.; Hengstler, J.G.; Fuchs, J. (1994). Cigarette smoking protects mononuclear blood cells of carcinogen exposed workers from additional work exposure-induced DNA single strand breaks. **Mutat. Res.** 321(3): 175-185.
- Pages, V. & Fuchs, R.P. (2002). How DNA lesions are turned into mutations within cells? **Oncogene** 21: 8957-8966.
- Palus, J.; Rydzynski, K.; Dziubaltowska, E.; Wyszynska, K.; Natarajan, A.T.; Nilsson, R. (2003). Genotoxic effects of occupational exposure to lead and cadmium. **Mutat. Res.** 540: 19-28.
- Pandey, A.K.; Bjaypayee, M.; Parmar, D.; Kumar, R.; Rastoji, S.K.; Mathur, N.; Thorning, P.; Matas, M. de.; Shao, Q.; Anderson, D.; Dhawan, A. (2008).

- Multipronged evaluation of genotoxicity in Indian petrol-pump workers. **Environ. Mol. Mutagen.** 49: 695 – 707.
- Pardo, B.; Gómez-González, B.; Aguilera, A. (2009) DNA double-strand breaks repair: how to fix a broken relationship. **Cell Mol. Life Sci.** 66: 1039 – 1056.
- Pariselli, F.; Sacco, M.G.; Ponti, J.; Rembges, D. (2009). Effects of toluene and benzene air mixtures on human lung cells (A549). **Experimen. Toxicol. Pathol.** 61: 381-386.
- Park, J.; Lee, C.G.; Ryu, S.Y. (2006). Factors related to the prevalence of respiratory symptoms in workers in a petrochemical complex. **J. Occup. Health** 48 (3): 216-222.
- Piña-Calva, A.; Madrigal-Bujaidar, E.; Fuentes, M.V.; Neria, P.; Pérez-Lucio, C.; Vélez-Zamora, N.M. (1991). Increased frequency of chromosomal aberrations in railroad car painter. **Arch. Environ. Health** 46(6): 335-339.
- Pinto, D.; Ceballos, J.M.; García, G.; Guzmán, P.; Del Razo, L.M.; Vera, E.; Gómez, H.; García, A.; Gonsebatt, M.E. (2000). Increased cytogenetic damage in outdoor painters. **Mutat. Res.** 467:105-111.
- Pitarque, M.; Vaglenov, A.; Nosko, M.; Pavlova, S.; Petkova, V.; Hirvonen, A.; Creus A.; Norppa, H.; Marcos, R. (2002) Sister chromatid Exchange and micronuclei in peripheral lymphocytes of shoe factory workers exposed to solvents. **Environ. Health Perspec.** 110(4): 399 – 404.

- Reeves, J.F.; Davies, S.J.; Dodd, N.J.; Jha, A.N. (2008) Hydroxyl radicals ($\cdot\text{OH}$) are associated with titanium dioxide (TiO_2) nanoparticle- induced cytotoxicity and oxidative DNA damage in fish cells. **Mutat. Res.** 640 (1-2): 113-122.
- Revilla, A.; Pestana, C.R.; Pardo-Andreu, G.L.; Santos, A.C.; Uyemura, S.A.; Gonzales, M.E.; Curti, C. (2007). Potential toxicity of toluene and xylene evoked by mitochondrial uncoupling. **Toxicol. in Vitro** 21: 782 – 788.
- Roma-Torres, J.; Teixeira, J.P.; Silva, S.; Laffon, B.; Cunha, L.M.; Méndez, J.; Mayan, O. (2006). Evaluation of genotoxicity in a group of workers from a petroleum refinery aromatic plant. **Mutat. Res.** 604: 19-27.
- Rombaldi, F.; Cassini, C.; Salvador, M.; Saffi, J.; Erdtmann, B. (2009). Occupational risk assessment of genotoxicity and oxidative stress in workers handling anti-neoplastic drugs during a working week. **Mutagenesis** : 1-6.
- Roos, W.P. & Kaina, B. (2006). DNA damage-induced cell death by apoptosis. **Trends Mol. Med.** 12: 440-450.
- Saffi, J. & Henriques, J.A.P. (2003) Reparação de DNA em células eucarióticas. In: Da Silva, J; Erdtmann, B; Henriques, JAP. **Genética Toxicológica**, 1ª. Ed, Alcance, Porto Alegre, 424 p.
- Santibáñez, M.; Bolumar, F.; García, A.M. (2007). Occupational risk factor in Alzheimer's disease: a review assessing the quality of published epidemiological studies. **Occup. Environ. Med.** 64 (11): 723-732.

- Sawicka, E. & Dlugosz, A. (2008). Toluene and p-xylene mixture exerts antagonistic effect on lipid peroxidation in vitro. **Int. J. Occup. Med. Environ. Health** 21(3): 201-209.
- Scélo, G.; Metayer, C.; Zhang, L.; Wiemels, J.L.; Aldrich, M.C.; Selvin, S.; Month, S.; Smit, M.T.; Buffler, P.A. (2009). Household exposure to paint and petroleum solvents, chromosomal translocations, and the risk of childhood leukemia. **Environ. Health. Perspec.** 117 (1): 133-139.
- Schmid, W. (1975). The micronucleus test. **Mutat. Res.** 31: 9-15.
- Silva, J.; Freitas, T. R. O.; Marinho, J. R. (2000). Alkaline single-cell gel electrophoresis (comet assay) to environmental in vivo biomonitoring with native rodents. **Genet. Mol. Biol.** 23(1): 241-245.
- Silva, J.M.; Santos-Mello, R. (1996). Chromosomal aberrations in lymphocytes from car painters. **Mutat. Res.** 368 (1): 21-5.
- SIMECS – Sindicato das Indústrias metalúrgicas, mecânicas e de material elétrico de Caxias do Sul (2009). **Disponível (online)** <http://www.simecs.com.br/empresas-do-simecs/resultados-economicos.asp> (30 de agosto).
- Singh, N.P.; McCoy, M.T.; Tice, R.R.; Schneider, L.E. (1988). A simple technique for quantitation follow levels of DNA damage in individual cells. **Exp. Cell Res.** 175: 184-191.

Sistema Nacional de Informações Tóxico Farmacológicas (2007). Registros de intoxicações. **Disponível** **(online)**

http://www.fiocruz.br/sinitox_novo/cgi/cgilua.exe/sys/start.HTM (30 de outubro)

Testa, A.; Festa, F.; Ranaldi, R.; Giachelia, M.; Tirindelli, D.; De Marco, A.; Owczarek, M.; Guidotti, M.; Cozzi, R. (2005). A multi-biomarker analysis of DNA damage in automobile painters. **Environ. Mol. Mutagen.** 46(3): 182-188.

Thomas, P.; Sarah, H.; Gruner, T.; Fenech, M. (2008). The buccal cytome and micronucleus frequency is substantially altered in Down's syndrome and normal ageing compared to young healthy controls. **Mutat. Res.** 638: 37-47

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

Tolbert, P.E.; Shy, C.M.; Allen, J.W. (1991). Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: a field test in snuff users. **Am. J. Epidemiol.** 134: 840-850.

Torres, C.H.; Varona, M.E.; Lancheros, A.; Patiño, R.I.; Groot, H. (2008). DNA damage assessment and biological monitoring of occupational exposure to organic solvents, 2006. **Biomedica** 28(1): 126-138.

Ursini, M.V.; Parrella, A.; Rosa, G.; Salzano, S. & Martini, G. (1997). Enhanced expression of glucose-6phosphohate dehydrogenase in human cells sustaining oxidative stress. **Biochem. J.** 323:801-806

- Valko, M.; Morris, H.; Cronin, M.T.D. (2005). Metals, toxicity and oxidative stress. **Current Med. Chem.** 12: 1161-1208.
- Valverde, M. & Rojas, E. (2009). Environmental and occupational biomonitoring using comet assay. **Mutat. Res.** 681, 93-109.
- Vondracek, M.; Xi, Z.; Larsson, P.; Baker, V.; Mace, K.; Pfeifer, A.; Tjalve, H.; Donato, M.T.; Gomez-Lechon, M.J.; Grafstrom, R.C. (2001). Cytochrome P450 expression and related metabolism in human buccal mucosa. **Carcinogenesis** 22(2001): 481-488.
- Wyman, C. & Kanaar, R. (2006). DNA double-strand break repair: all's well that ends well. **Annu. Rev. Genet.** 40: 363-383.
- Xie H.; Holmes A.L.; Young J.L.; Qin Q.; Joyce K.; Pelsue S.C.; Peng C.; Wise S.S.; Jeevarajan A.S.; Wallace W.T.; Hammond D.; Wise J.P. (2009). Zinc chromate induces chromosome instability and DNA double strand breaks in human lung cells. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** 234 (3):293-299.
- Zarani, F.; Papazafiri, P.; Kappas, A. (1999). Induction of micronuclei in human lymphocytes by organic solvents in vitro. **J. Environ. Path. Toxicol. Oncol.** 18(1): 21-28.
- Zelko, I.N.; Mariani, T.J.; Folz, R.J. (2002). Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the Cu-Zn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2) and EC-SOD (SOD3) gene structure, evolution and expression. **Free Radic. Biol. Med.** 33(3): 337-49.
- Zhu, C.Q.; Lam, T.H.; Jiang, C.Q. (2001). Lymphocyte DNA damage in bus manufacturing workers. **Mutat. Res.** 491 (1-2): 173-181.

9. ANEXOS

ANEXO I

**APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA DA UNIVERSIDADE DE CAXIAS
DO SUL**



UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL

Caxias do Sul, 08 de junho de 2007.

Parecer CEP Nº 20/07

Ilma. Sra.

Profa. Mirian Salvador

Prezada Pesquisadora:

Informamos que em reunião realizada em 05 de junho de 2007, o projeto de pesquisa "Avaliação do estresse oxidativo e genotoxicidade em trabalhadores expostos a tintas industriais e automotivas." foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

Colocamo-nos à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessários.

Atenciosamente,



Prof. Dr. Celso Piccoli Coelho

Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa

ANEXO II

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto de Pesquisa

“AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO E GENOTOXICIDADE EM TRABALHADORES EXPOSTOS A TINTAS INDUSTRIAIS E AUTOMOTIVAS”

A exposição a tintas industriais e automotivas pode, eventualmente, levar a problemas de saúde. Para evitar isto, são utilizados equipamentos de segurança e de proteção individual. O uso correto desses equipamentos previne contra essa situação. Para verificar se a utilização desses equipamentos está adequada, este trabalho objetiva realizar análises sanguíneas e urinárias nos trabalhadores de indústrias de tintas.

O voluntário participará deste projeto através de doação de, aproximadamente, 10mL de sangue venoso do braço direito ou esquerdo. A coleta será realizada por profissional capacitado. A participação também se fará por meio da doação de urina, cuja coleta será realizada pelo próprio voluntário, que será instruído para isso, num frasco próprio para o ensaio. Também será realizada a coleta de células da mucosa bucal por profissional treinado através de escovas individualizadas. Os voluntários do projeto responderão a um questionário sobre seu ambiente de trabalho, alimentação, uso de medicamentos, entre outros. Eventualmente poderão ocorrer dor e hematomas na região da picada da agulha.

Os resultados dos ensaios serão comunicados ao voluntário, que receberá as informações necessárias sobre cada parâmetro analisado. Todas as dúvidas dos voluntários serão esclarecidas a qualquer momento por um dos representantes da pesquisa. A qualquer momento o voluntário, se for de sua vontade, poderá interromper sua participação no projeto de pesquisa, bastando para tanto informar à coordenação do projeto.

Todas as análises serão realizadas de forma confidencial, não sendo identificado o voluntário e sem custo algum para o participante dessa pesquisa.

Eu, fui informado dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão se assim

eu o desejar. A Profa. Dra. Mirian Salvador certificou-me de que todos os dados desta pesquisa serão confidenciais e terei liberdade de retirar meu consentimento de participação na pesquisa, face a estas informações.

Caso tiver novas perguntas sobre este estudo, posso chamar Profa. Dra. Mirian Salvador no telefone (054) 32182105. Para qualquer pergunta sobre os meus direitos como participante deste estudo ou se penso que fui prejudicado pela minha participação, posso chamar a Profa. Dra. Mirian Salvador no telefone (054) 32182105

Declaro que recebi cópia do presente Termo de Consentimento.

Assinatura do voluntário da pesquisa

Nome do voluntário
___/___/___

Assinatura do Pesquisador

Nome do Pesquisador
___/___/___

Este formulário foi lido para _____ em
___/___/___ pelo _____ enquanto eu estava
presente.

Assinatura de testemunha

Nome da testemunha

ANEXO III

QUESTIONÁRIO DE SAÚDE OCUPACIONAL

QUESTIONÁRIO DE SAÚDE OCUPACIONAL

HISTÓRIA PESSOAL

1. Idade: _____(em anos).
2. Sexo: () Masculino () Feminino

HISTÓRIA OCUPACIONAL (somente para os indivíduos expostos)

3. Local de trabalho: _____.
4. Tempo de trabalho neste local: _____.
5. Atividade que realiza: _____.
6. Onde você trabalhou previamente, qual atividade que realizava e por quanto tempo:

7. Qual a sua carga horária diária? _____
8. Neste período, quantas horas você está exposto às tintas? _____
9. Quais são os equipamentos de proteção individual usados por você?

HISTÓRIA DE FUMO

10. Alguma vez você fumou? () Sim () Não

Se não, passe para questão 16. Se sim:

- a. Quanto tempo você fumou? _____
- b. Você fuma atualmente? () Sim () Não

Se sim, passe para a 15c.

Se não: Quando você parou de fumar? _____ (mês e ano).

MEDICAMENTOS E DOENÇAS

11. Você tem tomado algum medicamento prescrito pelo médico no último ano (por exemplo, comprimidos para pressão, insulina, tranqüilizantes, relaxantes musculares, etc.)?

Tipo de medicamento: Dose: Quantos por dia: Início(mês) Término (mês)

12. Você tem tomado algum medicamento não prescrito por médico no último ano (por exemplo, aspirina, anti-ácidos, anti-histamínicos, sedativos ou outras drogas)?

Tipo de medicamento: Dose: Quantos por dia: Início(mês) Término (mês)

13. Você toma ou tomou alguma vitamina nos últimos 6 meses?

Tipo de vitamina: Dose: Quantos vezes por semana:

14. Você teve ou tem alguma doença?

Se sim, indique abaixo:

Doença: Período da doença: Tratamento:

15. Liste os raios-X diagnósticos e terapêuticos, se você recebeu no último ano.

Razão para o raio-X Data:

16. Fez alguma cirurgia durante o último ano?

Data:

Razão:

_____.

17. Teve febre nos últimos 06 meses?

Data(mês):

Doença associada:

Medicamento tomado:

_____.

DIETA (deve refletir apenas os hábitos freqüentes)

18. Comente sobre sua dieta, caso ela tenha algo de especial (por exemplo, dieta rica em proteínas e pobre em carboidratos, etc.).

_____.

19. Você bebe cerveja? Sim Não

Se sim, indique sua média de consumo semanal: _____

20. Você bebe vinho? Sim Não

Se sim, indique sua média de consumo semanal:

21. Você bebe outras bebidas alcoólicas (excluindo cerveja e vinho)?

Sim Não

Se sim, qual ou quais? _____

Indique a sua média de consumo semanal: _____

HISTÓRIA GENÉTICA

22. Você tem conhecimento de algum defeito de nascimento ou outra desordem genética ou doença hereditária que tenha afetado seus pais, irmãos, irmãs ou seus filhos?

Sim Não

Se sim, por favor especifique: _____

23. Você já teve um filho que tenha nascido prematuramente ou tenha sido abortado?

Sim Não