

## **Importância do polimorfismo OGG1 Ser326Cys no estudo dos efeitos para a saúde que resultam da exposição ocupacional a genotóxicos - O caso da exposição a antineoplásicos**

### ***OGG1 Ser326Cys polymorphism role in the study of health effects resulting from occupational exposure to genotoxic - The case of exposure to antineoplastic drugs***

Ladeira, Carina<sup>1,2</sup>; Viegas, Susana<sup>1,3</sup>; Pádua, Mário<sup>1</sup>, Carolino, Elisabete<sup>1,2</sup>; Gomes, Manuel C.<sup>4</sup>; Brito, Miguel<sup>2</sup>

#### Resumo

*O ensaio cometa é um dos ensaios de avaliação de genotoxicidade mais promissores de avaliação do risco humano, sendo recomendado para a monitorização de populações com exposição crónica a agentes genotóxicos. Os laboratórios são ambientes profissionais em que os trabalhadores podem encontrar-se expostos a agentes químicos. As drogas antineoplásicas são agentes químicos que são considerados carcinogénicos e, desta forma, medidas de protecção especiais devem ser adoptadas. O objectivo desta investigação é contribuir para o desenvolvimento de um programa de biomonitorização que inclui a avaliação de genotoxicidade relacionada com biomarcadores de susceptibilidade genética. Foram constituídas duas amostras: uma de indivíduos expostos aos fármacos antineoplásicos (n=46), e uma amostra de controlo sem exposição (n=46). Os participantes preencheram um questionário. O ensaio do cometa foi utilizado para avaliar a genotoxicidade. Os biomarcadores de susceptibilidade genética, ou seja, os polimorfismos OGG1 Ser326Cys foram realizados por PCR em Tempo Real. O ensaio do cometa não identificou diferenças estatisticamente significativas entre aqueles expostos a citostáticos e controlos, e a mesma falta de associação se verificou no que concerne aos génotipos do OGG1. Os resultados obtidos reforçam a necessidade da implementação de um programa de biomonitorização dos trabalhadores expostos ocupacionalmente a drogas neoplásicas.*

Palavras-chave: biomonitorização; genotoxicidade; exposição ocupacional; drogas antineoplásicas

#### Abstract

*Comet assay is one of the most promising short-term genotoxicity assays for human risk assessment and is recommended to monitor populations chronically exposed to genotoxic agents. Laboratories are occupational settings where chemical agents are handled and workers are exposed. Antineoplastic drugs, in particular, are chemical agents handled in laboratories that are considered carcinogenic for humans and special protective measures should thus be adopted against them.*

*The aim of this investigation is to contribute to the development of a biomonitoring programme that includes genotoxicity assessment related with genetic susceptibility biomarkers.*

*The experimental planning used was a case-control blinded study. Two samples of subjects exposed to antineoplastic drugs (n=46), and one sample of non-exposed controls (n=46). Participants filled-in a personal questionnaire. Comet assay was used to assess genotoxicity. Individual susceptibility, namely the OGG1 Ser326Cys polymorphisms was investigated by Real Time PCR. Comet assay did not identify significant differences between those exposed to cytostatics and controls, and the same lack of association applies to the OGG1 genotypes. Our findings emphasize the need for the implementation of a regular biomonitoring programme of personnel occupationally exposed to drugs like cytostatics.*

Keywords: Biomonitoring; genotoxicity; occupational exposure; antineoplastic drugs.

### **1. Teoria**

A utilização dos métodos da biologia molecular na investigação epidemiológica – designada de epidemiologia molecular – tem enorme potencial para a definição de associações entre patologias

<sup>1</sup> Environment and Health Research Group, Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa – IPL, Portugal

<sup>2</sup> Grupo de Investigação em Genética e Metabolismo, Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa – IPL, Portugal

<sup>3</sup> Centro de Investigação em Saúde Pública (CISP/ENSP/UNL), 1600-560 Lisboa, Portugal

<sup>4</sup> Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Portugal

oncológicas e exposição ambiental relacionada com estilos de vida, ocupação profissional ou poluição ambiental (Portier & Bell, 1998; Vainio, 1998; Bartsch, 2000). A biomonitorização humana consiste, por um lado, na pesquisa e identificação de condições ambientais perigosas e, por outro, na estimação do risco de desenvolvimento de cancro por exposição a estas condições. Dado que a carcinogénese é um processo prolongado, os biomarcadores a que se tem recorrido para reconhecer eventos biológicos anormais têm sido desenvolvidos no âmbito de estudos epidemiológicos moleculares (Watson & Mutti, 2004; Bertazzi & Mutti, 2008; Manno et al., 2010). Estes biomarcadores são quantificáveis e permitem a identificação da progressão de condições biológicas normais para anormais ao nível molecular. De uma forma geral, subdividem-se em biomarcadores de exposição, de efeito e de susceptibilidade genética (Manno et al., 2010). Os biomarcadores de genotoxicidade são um caso particular de biomarcadores de efeito e utilizam-se na avaliação de efeitos genómicos provocados por exposição, ambiental ou ocupacional, sendo em geral considerados preditores de desenvolvimento cancerígeno.

Os laboratórios são importantes locais de exposição ocupacional, uma vez que se manipula uma panóplia de agentes químicos que conferem um risco permanente de exposição por parte dos trabalhadores. A exposição de pacientes e profissionais de saúde a misturas de fármacos antineoplásicos em ambientes hospitalares tem efeitos imprevisíveis e únicos, uma vez que estes medicamentos são provados mutagénicos, carcinogénicos e teratogénicos. No caso particular dos profissionais de saúde, o contacto com estas drogas, quer por manuseamento ou administração, acarreta riscos potenciais de exposição, ou seja, possível dano oxidativo do DNA. Os antineoplásicos, são um grupo de fármacos cada vez mais utilizados, quer no tratamento de neoplasias quer no de doenças não malignas. São um grupo heterogéneo que compreende diversos agentes não relacionados mas que têm em comum a capacidade de inibir o crescimento celular, afectando, directa ou indirectamente, o genoma (Fucic et al., 1998; Burgaz et al., 1999; Bouraoui et al., 2011; Gulten et al., 2011; Sessink & Bos, 1999; Buschini et al., 2013). A título de exemplo, a IARC classifica como carcinogénico para humanos (grupo 1) a ciclofosfamida e o paclitaxel, não considerando carcinogénico para humanos o 5-fluoracil (grupo 3).

A OGG1 é considerada a principal enzima responsável pela remoção de 8-OHdG em seres humanos, realizando esta remoção quando emparelhado com a citosina. Alguns resultados indicam que a inactivação da OGG1 desempenha um papel no processo de carcinogénese. Um polimorfismo comum deste gene, é o polimorfismo Ser326Cys (rs1052133) que resulta na substituição de uma citosina por uma guanina (C → G) na posição 1245 no exão 7 e está associado a um risco aumentado de cancro (Boiteux & Radicella, 1999; Ersson, 2011).

O ensaio cometa em electroforese alcalina, permite a quantificação de dano no DNA de células individuais. Grande parte das lesões detectadas por esta técnica podem não ser posteriormente corrigidas pelos mecanismos normais de reparação do DNA, não se detectando, portanto, alterações genéticas que sejam necessariamente permanentes (Tice et al., 2000; Collins, 2004; Azqueta et al., 2009).

O objetivo deste estudo foi investigar o papel do polimorfismo Ser326Cys (rs1052133) no gene OGG1 em associação com dano oxidativo no DNA através da aplicação da técnica do ensaio cometa em electroforese alcalina de forma a avaliar os eventuais efeitos da exposição ocupacional a antineoplásicos.

## 2. Metodologia

O planeamento experimental utilizado pode ser descrito como um estudo caso-controlo. Foram constituídas duas amostras: uma de trabalhadores expostos (os casos) e outra de não expostos (os controlos), tendo sido quantificados biomarcadores moleculares de genotoxicidade e avaliado o risco danos genómicos nos expostos por comparação com os controlos. Desta forma, foram reunidos 46 trabalhadores expostos a citostáticos das unidades de Farmácia, Hospital de dia e Pediatria de dois hospitais da região de Lisboa e Vale do Tejo e o grupo de controlo foi igualmente formado por 46 indivíduos da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa. Todos os participantes preencheram um termo de consentimento informado acerca da participação no estudo e na recolha das amostras, assegurando princípios de confidencialidade. Foi preenchido um questionário para caracterização de dados demográficos e de possíveis variáveis de confundimento, tais como exposições na sua ocupação laboral e/ou de tempos livres que pudessem enviesar os resultados, contacto com terapias antineoplásicas, entre outros.

A avaliação da genotoxicidade foi realizada com recurso ao ensaio cometa em electroforese alcalina. Esta técnica foi realizada em linfócitos isolados de sangue periférico recolhido por venipunctura. Para avaliar os biomarcadores de susceptibilidade individual, nomeadamente os

polimorfismos do genes de reparação de DNA (OGG1), foi realizado PCR em Tempo Real após extracção de DNA por mancha de sangue.

### 3. Evidência

A amostra de expostos tem como média de idades de  $33,85 \pm 1,21$  anos e era constituída por 87% do género feminino e 13% do género masculino. O grupo controlo tem como média de idades de  $39,26 \pm 1,42$  anos e era constituída por 73,9% do género feminino e 26,1% do género masculino. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas (teste de Mann-Whitney,  $p > 0,05$ ) entre indivíduos com e sem exposição, quanto dano oxidativo ao DNA, no entanto, o grupo exposto apresentou valores mais elevados. Além disso, não houve nenhuma tendência consistente em relação à variação de biomarcadores com polimorfismos OGG1.

Os resultados obtidos confirmam que aqueles que manipulam continuamente fármacos antineoplásicos por razões profissionais são susceptíveis a um maior risco de dano genotóxico, uma vez que aumenta o dano no ADN, no entanto, comparativamente com o grupo controlo não existe uma diferença estatisticamente significativa. Estudos de Ursini *et al.* (2006) e Buschini *et al.* (2013) corroboram os resultados obtidos nesta investigação.

### 4. Referências

Azqueta A., Shaposhnikov S. & Collins A. (2009). Detection of oxidised DNA using DNA repair enzymes. In: *The Comet Assay in Toxicology*. [Online]. Royal Society of Chemistry, pp. 58-63. Available from: [www.rsc.org](http://www.rsc.org).

Bartsch, H. (2000). Studies on biomarkers in cancer etiology and prevention: a summary and challenge of 20 years of interdisciplinary research. *Mutation Research-Reviews in Mutation Research*. 462 (2-3). p.pp. 255-279.

Bertazzi, P.A. & Mutti, A. (2008). Biomarkers, Disease Mechanisms and their Role in Regulatory Decisions. In: C. Wild, P. Vineis, & S. Garte (eds.). *Molecular Epidemiology of Chronic Diseases*. [Online]. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 243-254.

Boiteux, S. & Radicella, J.P. (1999). Base excision repair of 8-hydroxyguanine protects DNA from endogenous oxidative stress. *Biochimie*. 81 (1-2). p.pp. 59-67.

Bouraoui, S., Brahem, A., Tabka, F., Mrizek, N., Saad, A. & Elghezal, H. (2011). Assessment of chromosomal aberrations, micronuclei and proliferation rate index in peripheral lymphocytes from Tunisian nurses handling cytotoxic drugs. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 31 (1). p.pp. 250-257.

Burgaz, S., Karahalil, B., Bayrak, P., Taşkin, L., Yavuzaslan, F., Bökesoy, I., Anzion, R.B., Bos, R.P. & Platin, N. (1999). Urinary cyclophosphamide excretion and micronuclei frequencies in peripheral lymphocytes and in exfoliated buccal epithelial cells of nurses handling antineoplastics. *Mutation Research*. 439 (1). p.pp. 97-104.

Buschini, A., Villarini, M., Feretti, D., Mussi, F., Dominici, L., Zerbini, I., Moretti, M., Ceretti, E., Bonfiglioli, R., Carrieri, M., Gelatti, U., Rossi, C., Monarca, S. & Poli, P. (2013). Multicentre study for the evaluation of mutagenic/carcinogenic risk in nurses exposed to antineoplastic drugs: assessment of DNA damage. *Occupational and Environmental Medicine*. 70 (11). p.pp. 789-794.

Collins, A.R. (2004). The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Molecular biotechnology*. 26 (3). p.pp. 249-261.

Ersson, C. (2011). *International validation of the comet assay and a human intervention study*. Stockholm: Karolinska Institutet.

Fucic, A., Jazbec, A., Mijic, A., Šešo-Šimic, đ & Tomek, R. (1998). Cytogenetic consequences after occupational exposure to antineoplastic drugs. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 416 (1-2). p.pp. 59-66.

Gulten, T., Evke, E., Ercan, I., Evrensel, T., Kurt, E. & Manavoglu, O. (2011). Lack of genotoxicity in medical oncology nurses handling antineoplastic drugs: effect of work environment and protective equipment. *Work (Reading, Mass.)*. 39 (4). p.pp. 485-489.

Manno, M., Viau, C., in collaboration with, Cocker, J., Colosio, C., Lowry, L., Mutti, A., Nordberg, M. & Wang, S. (2010). Biomonitoring for occupational health risk assessment (BOHRA). *Toxicology letters*. 192 (1). p.pp. 3-16.

Portier, C.J. & Bell, D.A. (1998). Genetic susceptibility: significance in risk assessment. *Toxicology Letters*. 102-103. p.pp. 185-189.

Sessink, P.J. & Bos, R.P. (1999). Drugs hazardous to healthcare workers. Evaluation of methods for monitoring occupational exposure to cytostatic drugs. *Drug safety: an international journal of medical toxicology and drug experience*. 20 (4). p.pp. 347-359.

Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., 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. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 35 (3). p.pp. 206-221.

Ursini, C.L., Cavallo, D., Colombi, A., Giglio, M., Marinaccio, A. & Iavicoli, S. (2006). Evaluation of early DNA damage in healthcare workers handling antineoplastic drugs. *International Archives of Occupational and Environmental Health*. 80 (2). p.pp. 134-140.

Vainio, H. (1998). Use of biomarkers — new frontiers in occupational toxicology and epidemiology. *Toxicology Letters*. 102-103. p.pp. 581-589.

Watson, W.P. & Mutti, A. (2004). Role of biomarkers in monitoring exposures to chemicals: present position, future prospects. *Biomarkers*. 9 (3). p.pp. 211-242.