

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA
SERGIO AROUCA
ENSP

“Estudo dos Efeitos Genotóxicos do Amianto em Trabalhadores Expostos”

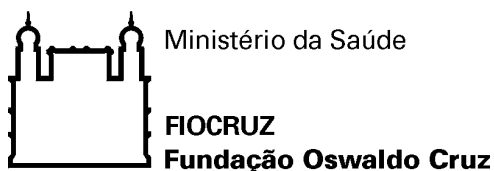
por

Isabele Campos Costa

Dissertação apresentada com vistas à obtenção do título de Mestre em Ciências na área de Saúde Pública.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Rita de Cássia Oliveira da Costa Mattos

Rio de Janeiro, maio de 2009.



Esta dissertação, intitulada

“Estudo dos Efeitos Genotóxicos do Amianto em Trabalhadores Expostos”

apresentada por

Isabele Campos Costa

foi avaliada pela Banca Examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Adriano Caldeira de Araujo

Prof. Dr. Hermano Albuquerque de Castro

Prof.^a Dr.^a Rita de Cássia Oliveira da Costa Mattos – Orientadora

Dissertação defendida e aprovada em 26 de maio de 2009.

Catálogo na fonte
Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica
Biblioteca de Saúde Pública

C837 Costa, Isabele Campos
Estudo dos efeitos genotóxicos do amianto em trabalhadores
expostos. / Isabele Campos Costa. Rio de Janeiro: s.n., 2009.
78 f., il., tab.

Orientador: Mattos, Rita de Cássia Oliveira da Costa
Dissertação (mestrado) – Escola Nacional de Saúde Pública Sergio
Arouca, Rio de Janeiro, 2009

1. Asbesto. 2. Exposição Ocupacional. 3. Estresse oxidativo.
4. Ensaio cometa - genotoxicidade. I. Título.

CDD - 22.ed. – 363.11

"Só descobri a doença em 1995 quando alguns ex-colegas de trabalho começaram a adoecer e a falecer, inclusive parentes que trabalhavam comigo na Eternit. Desde então, tenho de tomar remédios todos os dias e estou impossibilitado de fazer qualquer tipo de esforço. Só o fato de caminhar já é complicado, pois meus pulmões estão se petrificando devido à doença. Tenho muita falta de ar, tonturas e muitas dores no corpo..."

"...os donos da companhia, além de não nos alertarem sobre os males do amianto, nunca forneceram equipamentos adequados para os trabalhadores da fábrica. Foi por esta negligência que eu e centenas de pessoas estamos condenadas à morte antes do tempo"

João Batista Momi, 72 anos, ex-operário da Empresa Eternit

"um caminho efetivo para proteger a saúde humana é o da proibição do uso de fibras de crisotila e dos produtos que a contém"

(Commission of the European Communities, 1999:20)

Aos meus queridos pais pelo amor incondicional e dedicação em toda minha formação.

Ao meu irmão pela amizade e parceria em toda minha trajetória.

Ao meu sobrinho lindo pelos momentos de alegria e descontração.

Aos meus avós, primos e tios pelo apoio e incentivo em todos os momentos deste estudo.

Ao meu companheiro Eros por todo amor, carinho, paciência e contribuição durante os importantes momentos da minha vida e na realização deste trabalho.

Perdão a todos pelos momentos de ausência, impaciência e nervosismo, durante a construção desta dissertação.

Agradecimentos

A Deus por minha vida, meus familiares e meus amigos e pela oportunidade de concretizar este trabalho, que realizo com muito amor e dedicação;

Aos trabalhadores que participaram deste estudo, pois sem a participação deles esta dissertação não teria se concretizado;

À minha querida orientadora e amiga Dra. Rita de Cássia Oliveira da Costa Mattos, pela dedicação e ensinamento durante minha formação desde a iniciação científica.

Ao Professor Dr. Adriano Caldeira de Araújo e de sua aluna Dra. Michelle Pinheiro pela parceria e disponibilidade para todas as dúvidas durante a construção desta dissertação.

À Professora Dra Maria Regina Amendoeira por disponibilizar o microscópio de fluorescência, de fundamental importância para a realização de nossas análises.

Aos Professores Dr. Hernando de Castro e Mestre Marcos Menezes pelas diversas orientações e explicações sobre o assunto e a exposição.

À Professora Dra. Carmem Marinho, pelo curto período de grandes ensinamentos.

Às Professoras Dras. Ana Braga e a Élide pelos diversos ensinamentos durante esta caminhada.

Aos companheiros de longa jornada Gilka, Adeilson, Clarissa, Maria, Martino, Davidson, Renata, Kivia, Thiago, Ingrid dentre outros, que me acompanharam e cresceram profissionalmente junto comigo.

Aos amigos do Laboratório de Toxicologia do CESTEJ, em especial aos do Setor de Indicadores Biológicos, Leandro, Vinício, Nathália, Murata, Carlúcio, Daniele, Daniel, Ely, Simone, Helena, Marcinha, Ana Luiza, Francisco e Amanda, por toda ajuda e apoio nos momentos mais difíceis.

Aos parceiros do Mestrado em Saúde Pública da ENSP da Área de Saúde, Trabalho e Ambiente, Wilma, Afrânio, Luciana, Sayonara, Priscilla, Ana Luiza, Francisco, Ana Cecília, Christiane, entre outros, por tornarem esta longa e difícil caminhada, muito divertida e prazerosa.

Ao amigo Mário, por todo trabalho e cuidado com nossas vidrarias e por ser o “quebra galho” de todas as horas.

Aos funcionários do Ambulatório, em especial a Cristiana, que proporcionaram o acolhimento dos trabalhadores e possibilitaram a realização de nossas coletas.

A Doutora Isabela, pela disponibilidade e contribuição voluntária no atendimento dos trabalhadores.

Siglas e Abreviaturas

AC – Aberrações cromossomiais

CA - Corpos asbestóticos

CAT - Catalase

CESTEH - Centro de Estudos da Saúde do Trabalhador e da Ecologia Humana

ENSP – Escola Nacional de Saúde Pública

EPI – Equipamento de proteção Individual

ERN - Espécies Reativas de nitrogênio

ERO - Espécies Reativas de Oxigênio

GPx - Glutathiona peroxidase

GSH - Glutathiona

GST- Glutathiona S-Transferase

Ig – Imunoglobulinas

IL- Intreleucinas

MA – Macrófagos Alveolares

MM- Mesotelioma maligno

MMS - Metil-metanosulfonato

MN - Micronúcleo

NF - Fator Nuclear

NK- Células Natural Killer

PHA – Fitohemaglutinina

PP- Placas pleurais

SCG - Single-Cell Gel

SCGE - Single-Cell Gel Eletrophoresis

SOD- Superóxido dismutase

SPC - Separação prematura centromérica

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral alfa

Lista de Quadros

<i>Quadro 1 – Classificação das doenças segundo sua relação com o trabalho.</i>	<i>2</i>
<i>Quadro 2 – Composição química dos seis tipos de asbestos importantes comercialmente.....</i>	<i>8</i>
<i>Quadro 3 – Doenças relacionadas ao amianto.....</i>	<i>12</i>
<i>Quadro 4 - Classificação das leituras de raios-x em categorias de 0 a 3, conforme as normas da OIT/2000.....</i>	<i>34</i>

Lista de Figuras

<i>Figura 1 - Classificação e cristalografia dos seis tipos de amianto importantes comercialmente.....</i>	<i>10</i>
<i>Figura 2 - Esquema das classificações das partículas em frações inaláveis, torácicas e respiráveis e seus possíveis locais de deposição.</i>	<i>15</i>
<i>Figura 3 - Mecanismos da imunidade celular envolvidos na inflamação das vias aéreas.</i>	<i>20</i>
<i>Figura 4 - Produção de radicais livres.</i>	<i>22</i>
<i>Figura 5 - Exemplos de indicadores biológicos relacionados à exposição ao asbesto... ..</i>	<i>27</i>
<i>Figura 6 - Esquema das etapas iniciais do projeto durante o período de sua realização.</i>	<i>33</i>
<i>Figura 7 - Fotografia da classificação do ensaio cometa.....</i>	<i>41</i>
<i>Figura 8 - Gráficos Boxplot comparativo dos indicadores biológicos entre as duas populações.</i>	<i>54</i>
<i>Figura 9 - Distribuição dos níveis dos indicadores de efeito do estresse oxidativo Catalase e GST dos trabalhadores exposto ao amianto.</i>	<i>62</i>
<i>Figura 10 - Curvas ROC para testar GST e Catalase para diagnosticar cometa > 25 e >40.</i>	<i>64</i>

Lista de Tabelas

<i>Tabela 1 - Quantidade de reagentes para o branco e amostras.</i>	38
<i>Tabela 2 - Comparação dos dados sócio-demográficos das duas populações estudadas.</i>	46
<i>Tabela 3 - Comparação dos resultados de variáveis entre a população exposta ao amianto e a população laboratório.</i>	48
<i>Tabela 4 - Comparação dos resultados de variáveis entre os grupos doente e não doente da população exposta ao amianto.</i>	55
<i>Tabela 5 - Comparação dos resultados de variáveis entre população fumante e ex-fumantes e não fumante do grupo laboratório.</i>	57
<i>Tabela 6 - Comparação dos resultados de variáveis entre população fumante e ex-fumantes e não fumante exposta ao amianto.</i>	58
<i>Tabela 7 - Cálculo de odds ratio relacionando hábito de fumar e exposição ao amianto.</i>	60
<i>Tabela 8 - Valores de Ensaio Cometa, expressos em UA e em %, com maior sensibilidade e especificidade, para diagnóstico de exposição ao amianto determinada por diferentes pontos de corte de cometa segundo as curvas ROC.</i>	63

Sumário

RESUMO	xiv
ABSTRACT	xv
I - INTRODUÇÃO	1
I.1 – Relação saúde, trabalho e doença	1
I.2 - Pneumoconioses	3
I.3 – O amianto ou asbesto	7
I.4- Efeitos sobre a Saúde Humana	12
I.5- Penetração e deposição de poeira mineral nos pulmões	15
I.6 – Resposta inflamatória do organismo a presença de fibras de amianto	16
I.7 - Instrumentos de Investigação Toxicológica	24
II - OBJETIVO	31
<i>Objetivo específico</i>	31
III- PROPOSTA METODOLÓGICA	32
III.1 - Desenho de estudo	32
III.2 - Procedimentos de avaliação física e clínica	33
<i>Exame físico e entrevista</i>	33
<i>Exames radiográficos do tórax</i>	33
<i>Teste tuberculínico cutâneo</i>	34
<i>Teste espirométrico</i>	34
III.3 - Coleta das amostras de sangue	35
III.4 - Determinações dos parâmetros do estresse oxidativo	35
III.4.1 - Catalase (CAT)	35
III.4.2 - Glutathione S-transferase	37
III.5 - Metodologia do Ensaio Cometa	39
III.6 - Análise dos resultados	42
IV – RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
IV.1. Dados Sócio Demográficos	43
IV.2 - Análises Clínicas e Toxicológicas	47
<i>Relação dos Indicadores com relação à doença</i>	54
<i>Relação dos indicadores com o hábito de fumar</i>	56

<i>Outras análises estatísticas</i>	61
<i>Considerações finais</i>	64
V - CONCLUSÕES	65
VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

RESUMO

A pneumoconiose é uma das mais recorrentes doenças pulmonares ocupacionais em todo mundo, estando a asbestose, uma das doenças relacionadas ao asbesto, em crescente número. O asbesto corresponde a um conjunto heterogêneo de fibras natural minerais, muito utilizado desde a antiguidade, e seus efeitos nocivos sobre a saúde humana constatados em diversos países. A inalação destas fibras causa o desenvolvimento de fibrose intersticial pulmonar intensa, envolvendo reação inflamatória, produção de colágeno e formação de granuloma. Além disso, também, está associada com a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) no trato respiratório inferior, resultando em estresse oxidativo. A produção elevada e contínua de ERO ou sua inadequada remoção pode suprimir o sistema de defesa antioxidante e ocasionar danos em moléculas celulares importantes, como proteínas e DNA, que futuramente podem resultar em câncer. Este estudo teve como objetivo avaliar alterações de parâmetros enzimáticos do estresse oxidativo e os danos genotóxicos decorrentes de exposição ao asbesto, em trabalhadores expostos e não-expostos, sendo os trabalhadores expostos, advindos de empresas que utilizam asbesto nos seus processos produtivos, localizadas na cidade do Rio de Janeiro, e os trabalhadores não expostos compostos de técnicos laboratoriais do Laboratório de Toxicologias do CESTE/ENSP/FIOCRUZ. Para tanto, foram realizados exames físicos, radiográficos de tórax, espirometria e entrevista, com a finalidade de avaliar o grau de acometimento dos indivíduos e a evolução clínica dos sintomas. O teste de Ensaio Cometa e a determinação das atividades das enzimas Catalase (CAT) e Glutathione S-Transferase (GST) foram utilizados na avaliação dos danos genotóxicos e dos parâmetros enzimáticos do estresse oxidativo. Sendo assim, trabalhadores expostos apresentaram 79,8% de alterações de função pulmonar e broncodilatação e 32,7% foram diagnosticados com asbestose. A população exposta ao amianto apresentou diferença bastante significativa dos resultados de ensaio cometa ($p < 0,000$) e da atividade da GST ($p < 0,01$), em comparação com a população não exposta. Estes resultados demonstram a relação entre a exposição ao asbesto e alterações enzimáticas do estresse oxidativo e danos no DNA, caracterizando um risco para as populações expostas ao amianto e contribuindo com evidências toxicológicas na luta do banimento do asbesto no Brasil.

ABSTRACT

The pneumoconiosis is one of the most recurrent occupational lung disease worldwide, with asbestosis, a disease related to asbestos, in increasing numbers. The asbestos is a heterogeneous set of natural mineral fibers, widely used since antiquity, and its harmful effects on human health were found in many countries. The inhalation of these fibers causes the development of interstitial pulmonary fibrosis intense, involving inflammation, production of collagen and formation of granuloma. It is also associated with the formation of reactive oxygen species (ROS) in the lower respiratory tract, resulting in oxidative stress. The high and continuous production of ROS or their improper removal can remove the antioxidant defense system and cause damage to important cellular molecules such as proteins and DNA, which in future may result in cancer. This study aimed to evaluate changes in enzymatic parameters of oxidative stress and genotoxic damage caused by exposure to asbestos in exposed workers and non-exposed, and the exposed workers are from companies that use asbestos in their production processes, located in the city of Rio de Janeiro, and the workers not exposed to compound laboratory technicians of the Laboratory of Toxicology of CESTEH / ENSP / FIOCRUZ. Therefore, we performed physical examinations, chest radiography, spirometry and interview, in order to evaluate the degree of involvement of individuals and the clinical evolution of the symptoms. The Comet test and the determination of the activities of enzymes Catalase (CAT) and Glutathione S-Transferase (GST) were used to assess the genotoxic damage and enzymatic parameters of oxidative stress. Thus, workers exposed showed 79.8% of changes in lung function and bronchodilation and 32.7% were diagnosed with asbestosis. The population exposed to asbestos showed significant difference of the results of comet assay ($p < 0.000$) and GST activity ($p < 0.01$), comparing with the non exposed population. These results demonstrate the relationship between exposure to asbestos and enzymatic changes of oxidative stress and DNA damage, showing a risk for people exposed to asbestos and contributing with toxicological evidences into the fight against the use of asbestos in Brazil.

I - INTRODUÇÃO

I.1 – Relação saúde, trabalho e doença

A saúde é um direito inerente a todo ser humano e abrange toda a amplitude de suas relações com o ambiente, familiares, grupos, sociedade e trabalho. O reconhecimento do trabalho como um fator determinante do processo saúde-doença e o trabalhador no centro deste processo, foi o principal desfecho para o surgimento de implicações éticas, técnicas e legais que se refletiram sobre as ações da Saúde do Trabalhador e da Saúde Pública. ⁽¹⁾

A Saúde do Trabalhador constitui uma área da Saúde Pública que tem como objeto o estudo e a intervenção das relações entre o trabalho e a saúde, promovendo e protegendo a saúde do trabalhador, por meio do desenvolvimento de ações de vigilância dos riscos presentes nos ambientes e nas condições de trabalho, dos agravos à saúde e da prestação da assistência aos trabalhadores, compreendendo procedimentos de diagnóstico, tratamento e reabilitação de forma integrada, no Sistema Único de Saúde (SUS). ^{(2), (3)}

O estabelecimento do nexos causal entre um determinado dano ou doença, sendo individual ou coletivo, e uma dada condição de trabalho é a situação básica, para a implementação de ações da Saúde do Trabalhador. Esse processo se inicia pela identificação e controle dos fatores de risco para a saúde humana, que estão presentes nos ambientes e nas condições de trabalho, e pelo diagnóstico, tratamento e prevenção de danos, lesões ou doenças provocados por estas condições. ⁽⁴⁾

O risco pode ser definido como a incidência ou a probabilidade de um determinado dano ou doença ocorrer em uma população exposta e o fator de risco representa uma probabilidade maior dessa população ser atingida por determinada afecção ou dano, podendo ser caracterizado como um aspecto do comportamento pessoal ou do estilo de vida, da exposição ao meio ambiente, ou uma característica própria ou herdada do indivíduo, tendo como base evidências epidemiológicas e estando associado a condições importantes de se prevenir e proteger a saúde. ^{(5), (6)}

Segundo Shilling (1984) ⁽⁷⁾, o perfil de adoecimento e morte dos trabalhadores, resultante da associação de fatores de risco relacionado ao trabalho, pode ser classificado em três grupos de “causas” que estão esquematizados no Quadro 1 a seguir.

Quadro 1 – Classificação das doenças segundo sua relação com o trabalho.

CATEGORIA	EXEMPLOS
I-Trabalho como causa necessária	Intoxicação por chumbo Silicose, asbestose “Doenças profissionais” legalmente reconhecidas
II-Trabalho como fator contributivo, mas não necessário.	Doenças coronarianas Doenças do aparelho locomotor Câncer Varizes dos membros inferiores
III-Trabalho como provocador de um distúrbio latente, ou agravador de doença já estabelecida.	Bronquite crônica Dermatite de contato alérgica Asma Doenças mentais

Fonte: Schilling (1984)⁽⁶⁾ adaptado por Ministério da Saúde do Brasil (2001)⁽³⁾

Entre os agravos específicos estão incluídas as “doenças profissionais”, para as quais se considera que o trabalho ou as condições em que ele é realizado constituem causa direta. Nos casos da relação causal ser direta e imediata, a eliminação do agente causador, por medidas de controle ou substituição, pode assegurar a prevenção da doença.⁽⁷⁾ Este grupo de agravos tem, também, uma conceituação legal, no âmbito do Seguro de Acidentes do Trabalho (SAT) da Previdência Social, e, sua ocorrência deve ser notificada segundo regulamentação na esfera da Saúde, da Previdência Social e do Trabalho (Lei 8212/91).⁽⁸⁾

As categorias II e III, do Quadro 1, são formadas por doenças consideradas de etiologia múltipla, ou causadas por múltiplos fatores de risco. Segundo Last (1995)⁽⁹⁾, para estes adoecimentos, o trabalho poderia ser compreendido como um fator de risco, ou seja, um atributo que aumenta a probabilidade de ocorrência de uma doença, mas não necessariamente um fator causal.

Nem sempre a relação entre a exposição a um fator de risco e o desenvolvimento de uma doença é facilmente reconhecida, especialmente quando este fator está relacionado com comportamentos sociais. Nas doenças crônicas, as primeiras manifestações podem surgir após muitos anos a exposição única ou contínua aos fatores de risco. Por isso, é importante considerar o conceito de período de latência, isto é, o período de tempo compreendido entre a exposição e o surgimento da doença.

Devido à dificuldade em se estabelecer uma relação causa-efeito, como no caso dos cânceres, o estudo da caracterização etiológica ou nexos causais deve ser, essencialmente, de natureza epidemiológica, através da observação de uma frequência elevada em

determinados grupos ocupacionais ou profissões, e de aumento quantitativo ou qualitativo do espectro de determinantes causais, a partir do estudo dos ambientes e condições de trabalho. Além disso, o longo período de tempo decorrido entre o início da exposição ao carcinógeno e a detecção clínica do tumor, dificultam a associação causal entre a exposição e a doença. ⁽¹⁰⁾

Outra dificuldade encontrada para o estabelecimento de uma relação entre a doença e o trabalho é a falta de informações sobre a história ocupacional dos indivíduos. Embora, existam procedimentos e questionários a serem utilizados, os mesmos, nem sempre, são realizados adequadamente. A escassez e inconsistência de informações sobre a real situação de saúde dos trabalhadores dificultam a definição de prioridades para as políticas públicas, o planejamento e a implementação das ações de Saúde do Trabalhador, impedindo melhorias para as condições de vida e trabalho. ⁽¹¹⁾

Segundo registros da Previdência Social, no período de 1999 a 2003, ocorreram, no Brasil, 1.875.190 acidentes de trabalho, sendo 15.293 com óbitos, 72.020 com incapacidade permanente e 105.514 casos de doenças relacionadas ao trabalho. ⁽¹¹⁾

Durante o ano de 2006, foram registrados, no INSS, cerca de 503,9 mil acidentes de trabalho. Comparado com 2005, o número de acidentes de trabalho registrados aumentou de 0,8%. Os acidentes típicos representaram 80% do total de acidentes, os de trajeto 14,7% e as doenças do trabalho 5,3%. ⁽¹²⁾

Apesar dos elevados números, estes dados não refletem a realidade, pois segundo estimativa da Organização Mundial de Saúde - OMS, na América Latina, apenas 1% a 4% das doenças do trabalho são notificadas. ⁽¹¹⁾

Entre as doenças relacionadas ao trabalho mais frequentes estão as Lesões por Esforços Repetitivos / Distúrbios Ósteo-Musculares Relacionados ao Trabalho (LER / DORT); formas de adoecimento mal caracterizadas e transtornos mentais, que convivem com as doenças profissionais clássicas, como as pneumoconioses, intoxicações por metais pesados e por agrotóxicos. ⁽¹¹⁾

I.2 - Pneumoconioses

As doenças pulmonares ocupacionais apresentam elevados índices de prevalência em todo o mundo. ⁽¹³⁾ As pneumoconioses são definidas pela Organização Internacional do Trabalho (OIT) como sendo “doenças pulmonares causadas pelo acúmulo de poeira nos pulmões e reação tissular à presença dessas poeiras” ⁽¹⁴⁾ e reúnem um conjunto de doenças

respiratórias conhecidas pelo agente principal causador. As principais pneumoconioses são silicose, asbestose, pneumoconiose de poeira mista, de carvão, talcose, siderose, baritose e estanhose. ^{(15),(16)}

As pneumoconioses podem ser divididas em fibrogênicas e não fibrogênicas, de acordo com o potencial da poeira em produzir fibrose reacional. Apesar de existirem tipos bastante comuns de pneumoconioses fibrogênicas e não fibrogênicas, como a silicose e a asbestose, de um lado, e a baritose, de outro, respectivamente, existe a possibilidade fisiopatogênica de poeiras tidas como não fibrogênicas produzirem algum grau de fibrose, dependendo da dose, das condições de exposição e da origem geológica do material. ⁽¹⁵⁾

Vários tipos de pneumoconioses de origem ocupacional têm sido descritas ao longo dos séculos. Antes da Revolução Industrial, a mineração e os trabalhos artesanais eram as principais ocupações que causavam tal doença. Com a industrialização e a aceleração de processos geradores de poeiras houve um incremento das doenças relacionadas às poeiras minerais nos últimos 100 anos.

A silicose e a asma ocupacional são as mais conhecidas doenças respiratórias, porém as doenças relacionadas ao asbesto ou amianto (DRA) vêm sendo diagnosticadas em crescente número. A exposição ocupacional ao amianto e seus efeitos à saúde são fatos amplamente constatados em todos os países industrializados e ainda persistem nos dias atuais. ^{(13),(17)}

Em 2006, a Organização Internacional do Trabalho ⁽¹⁸⁾ e Organização Mundial da Saúde ⁽¹⁷⁾ conjuntamente declararam que a maneira mais eficaz de eliminar as doenças relacionadas ao amianto é a não utilização de suas fibras e dos produtos que a contém. No entanto, atualmente, essas fibras ainda são amplamente utilizadas. ^{(17), (18), (19)}

Em 2006, um número estimado de 125 milhões de pessoas são ocupacionalmente expostas ao asbesto ao ano e 90.000 morrem devido às doenças relacionadas a esta exposição. ⁽¹⁷⁾

Por volta da década de 70, quando o uso de amianto teve seu ápice no Leste Europeu, na América do Norte, Japão e Austrália, aproximadamente 25 países extraíam o mineral e 85 produziam produtos com o mesmo. ⁽²⁰⁾ Conseqüentemente, foi estimado ocorrer cerca de 20.000 casos de câncer de pulmão asbesto-induzido anuais para essas populações. ⁽¹³⁾

Em 1983, a Islândia tornou-se o primeiro país a proibir o amianto e desencadeou o reconhecimento crescente, principalmente nos países ocidentais, dos riscos causados a

saúde associados à sua exposição. Posteriormente, mais de 40 países adotaram a sua proibição e a substituição de suas fibras nos processos industriais. ⁽¹⁸⁾ Entre países, que baniram o amianto, estão Alemanha, Arábia Saudita, Áustria, Bélgica, Dinamarca, Finlândia, França, Holanda, Inglaterra, Itália, Noruega, Nova Zelândia, Polônia, República Checa, Suécia e Suíça. ^{(21),(22)}

Na Europa, a Holanda, a Suécia, a Noruega e a Dinamarca foram os primeiros países a implementar o banimento total do asbesto. Na década de 90, a mesma decisão foi tomada pela Alemanha, Finlândia e, posteriormente, pela França. ⁽²¹⁾

Em 1999, a Comissão das Comunidades Europeias aprovou a Diretiva 1999/77/CE, que decidiu pela proibição total do uso do amianto em todos os países membros da União Europeia, que ainda não tinham tomado essa decisão. Na América Latina, Argentina, Chile e El Salvador tomaram a dianteira da proibição do amianto. ⁽²³⁾ Devido a essas diversas restrições, a dependência mundial com relação ao asbesto vem pouco a pouco diminuindo.

Entre as doenças relacionadas à exposição ao amianto, o mesotelioma é o mais sensível e específico indicador em populações e sua incidência anual foi estimada, em 1997, como sendo de 10.000 casos, na Europa Ocidental, América do Norte, Japão e Austrália. ^{(13),(24)}

O número anual de mortes por mesotelioma, na Grã-Bretanha, aumentou 12 vezes no período entre 1968 e 2001 e o modelo epidemiológico que incorporou o uso histórico sugeriu que o número anual de mortes por mesotelioma atingirá uma faixa de 1950-2400 mortes por ano entre 2011 e 2015. ^{(24),(25),(26)}

Estudos realizados por Peto, *et al.* (1995, 1999) ^{(27),(28)} previram um aumento dramático quanto ao número de mortes por mesotelioma no Reino Unido e na Europa. Várias projeções estatísticas foram feitas desde então, sugerindo que as mortes por mesotelioma vão aumentar em muitos países.

No Brasil, desde 1940, o asbesto é explorado comercialmente, expondo um grande número de trabalhadores a esse mineral. No entanto, não existe nenhum estudo epidemiológico, com metodologia de investigação científica adequada, que revelem os reais perfis sobre a saúde dos trabalhadores em relação a essa exposição no Brasil. Existem na literatura nacional apenas relatos e descrição de séries de casos. ⁽¹³⁾

Segundo Castro, H.A. *et al.* (2007) ⁽²⁹⁾, estima-se que o número de pessoas direta e ocupacionalmente expostas, no Brasil, seja de 500.000, das quais cerca de 200.000 são trabalhadores de indústrias de extração e transformação – mineração, cimento-amianto,

materiais de fricção e outros. Entretanto, há cerca de outros 300.000 trabalhadores envolvidos em manutenção e reparos de sistemas de freio no país, e uma parcela ainda maior, desconhecida, de trabalhadores informais, principalmente envolvidos na indústria da construção civil, em atividades como instalação de coberturas, caixas d'água, reformas, demolições, instalações hidráulicas, entre outras, que estão completamente à margem de qualquer proteção social e das incipientes políticas públicas da Saúde do Trabalhador. (29),(30)

Possivelmente, um grande número de trabalhadores está sob o risco de desenvolver asbestose, como resultado de exposições ocupacionais a esta poeira mineral, principalmente devido ao grande número de indústrias que ainda utilizam minerais de potencial fibrogênico no seu processo produtivo. Segundo, Castro HA, Giannasi F, Novello C. (2003) ⁽²³⁾ a incidência deve ser elevada entre os expostos, mas não há informações epidemiológicas referentes a séries históricas sobre as internações hospitalares nas diversas regiões do país.

Desde 1955 é reconhecida a relação causal entre a exposição ao asbesto e a ocorrência dos mesoteliomas de pleura e peritônio e câncer de pulmão, associados ou não à asbestose. Porém, apenas em 1995, os mesoteliomas foram reconhecidos como doença relacionada ao asbesto no Brasil. ⁽³⁾

A literatura brasileira descreve casos de asbestose ocorridos no Estado de São Paulo, em 2001, onde foram diagnosticados 74 (8,9%) casos em uma população de 828 trabalhadores expostos e 246 de casos suspeitos com espessamento pleural evidenciado na Tomografia Computadorizada de Tórax com Alta Resolução (TCAR). ^{(31),(32)} Vários outros casos de asbestose já tinham sido identificados por Giannasi e Thébaud-Mony, em 1997, na região de Osasco. O Estado de São Paulo concentra o maior número de indústrias consideradas de risco para as pneumoconioses, devido o seu grande desenvolvimento industrial e o fato de seu território apresentar diversas indústrias automobilísticas, de cerâmica, têxteis, entre outras.

Na Bahia, também, têm sido relatados casos de pneumoconiose em trabalhadores da mineração e casos de asbestose em trabalhadores da indústria com amianto. ⁽¹⁶⁾

Bezerra, *et al.* (2003), ⁽³⁴⁾ na região de Ouro Preto, identificaram 5 casos e 11 suspeitos de pneumoconiose por poeira liberada na atividade artesanal com pedra sabão. O estudo também revelou a presença de fibras de asbesto do grupo dos anfibólios (tremolita-actinolita), sugerindo a ocorrência de talcoasbestose entre os artesãos em pedra-sabão.

De 1999 a 2003, foram registrados, no Rio Grande do Sul, 25 óbitos por mesotelioma. Destes, em 19 foi possível detalhar a história ocupacional e ambiental, sendo que cinco casos tiveram exposição ocupacional (indústria do fibrocimento, construção civil e mecânico de automóveis - reparo de lonas de freio) e os demais têm história de exposição ambiental (residências com telhados de amianto).⁽³⁵⁾

No Estado do Rio de Janeiro, foram encontrados 26 (44,8%) casos de asbestose em um total de 58 trabalhadores expostos, sendo que os mesmos não foram registrados no Sistema de Informações Hospitalares (SIH) do SUS, refletindo uma possível dificuldade de associação do diagnóstico com a exposição e/ou falta de acesso desses trabalhadores aos serviços de saúde.^{(29),(36)}

I.3 – O amianto ou asbesto

O amianto ou asbesto corresponde a um conjunto heterogêneo de fibras naturais minerais pertencentes ao grupo dos silicatos cristalinos hidratados, que são utilizados desde a antiguidade.⁽¹⁴⁾ Os gregos utilizavam essas fibras como mecha das tochas dos templos e na produção de cerâmicas.⁽¹³⁾

As palavras asbesto e amianto originam-se do grego (*asbestos*) e do latim (*amianthus*) e significam “incombustível” e “incorrupível”, respectivamente.^{(37), (38)} Estes dois significados referem-se às suas propriedades físico-químicas de isolamento térmico; alta resistência a temperaturas, choques mecânicos, produtos químicos, microorganismos e abrasão; boa capacidade de filtração, isolamento elétrico e acústico; incombustibilidade; durabilidade; flexibilidade e alta afinidade por outros compostos formando matrizes estáveis, como cimentos, resinas e ligantes plásticos. Essas características físico-químicas garantiram e ainda garantem o amplo uso do amianto nos processos industriais, em especial na indústria de construção civil, com a produção de telhas e caixas d’água de cimento-amianto ou fibrocimento, e em outros setores de produção, como guarnições de freios, juntas, gaxetas, revestimento de discos de embreagem, sistemas de aquecimento, proteção de navios contra fogo ou calor, revestimento de estradas e materiais plásticos, tecidos, vestimentas especiais, extração de petróleo, pisos, tintas, entre outros.^{(38), (39)}

As fibras de amianto são derivadas de rochas magmáticas e metamórficas, que por processos naturais transfiguram-se em material fibroso, forma como são naturalmente encontradas.⁽⁴⁰⁾ Acredita-se que o amianto surgiu no Período Pré-Histórico, na fase secundária de formação da crosta terrestre, onde rochas de silício, compostas por

magnésio, cálcio, sílica e ferro, foram alteradas física e quimicamente por ações do calor, da água e da pressão, que lentamente atuavam sobre a superfície terrestre. Estes intemperismos favoreceram a associação entre os metais e a sílica, transformando quimicamente essas rochas, que se cristalizaram nas fendas da rocha-mãe, formando deposições de fibras. ⁽⁴¹⁾

Existem 30 variedades de fibras minerais asbestiformes conhecidas, porém apenas seis possuem importância comercial, que devido as suas diferentes composições químicas (Quadro 2) e cristalografias (Figura 1), têm, conseqüentemente, diferentes usos e classificações. ⁽⁴²⁾ Geologicamente, os seis tipos de fibras dividem-se em dois grandes grupos: serpentinas e anfibólios.

Dentro do grupo do serpentinito, encontra-se crisotila (asbesto branco), a mais utilizada no mundo. Entre os anfibólios estão a crocidolita (asbesto azul), a amosita (asbesto marrom), a antofilita, a actinolita e a tremolita. ^{(42),(43)}

Quadro 2 – Composição química dos seis tipos de asbestos importantes comercialmente.

Crisotila	$3\text{MgO}.2\text{SiO}_2.2\text{H}_2\text{O}$
Crocidolita	$\text{Na}_2\text{O}. \text{Fe}_2\text{O}_3.3\text{FeO}.8\text{SiO}_2.\text{H}_2\text{O}$
Amosita	$5,5\text{FeO}.1,5\text{MgO}.8\text{SiO}_2.\text{H}_2\text{O}$
Antofilita	$7\text{MgO}.8\text{SiO}_2.\text{H}_2\text{O}$
Tremolita	$2\text{CaO}.5\text{MgO}.8\text{SiO}_2.\text{H}_2\text{O}$
Actinolita	$2\text{CaO}.4\text{MgO}.\text{FeO}.8\text{SiO}_2.\text{H}_2\text{O}$

A crisotila apresenta-se em forma de fibras flexíveis, finas, longas, sedosas e com comprimento entre 1 e 40 milímetros. Suas fibras são caracterizadas por serem facilmente tecidas, resistentes ao calor e à alcalinidade forte e por serem instáveis em presença de ácidos. ⁽¹⁰⁾

O crisótilo corresponde mais de 98% dos asbestos utilizados comercialmente no mundo, devido em parte à sua abundância natural nas formações rochosas do planeta, estando presente nas reservas naturais de aproximadamente 40 países. Destes, 25 realizam a extração e a comercialização da crisotila, porém apenas 7 países são responsáveis por 95% da produção mundial, sendo eles Canadá, Rússia, Brasil, Cazaquistão, China, Zimbábue e África do Sul. ^{(14), (40), (10)} O Brasil, quinto maior produtor mundial de amianto, possui predominantemente crisotila em suas reservas. ⁽¹⁰⁾

A crocidolita, um dos componentes do grupo dos anfibólios, é uma variedade fibrosa da riebeckita ou “amianto azul” encontrada principalmente nos depósitos da África do Sul e da Austrália, sendo suas fibras retas e longas, de cor azul intensa, baixo ponto de fusão e alta resistência aos ácidos. ^{(40),(10)} Outro componente dos anfibólios é a amosita, variedade fibrosa da grunerita-cummingtonita, também conhecida como “amianto marrom”. Esta variedade possui fibras brilhantes, retas, com acentuada elasticidade, excelente resistência térmica e mecânica e é encontrada em minas da África do Sul, cuja mineração já foi proibida. ^{(40),(44)} A amosita e a crocidolita são os anfibólios considerados de mais elevada qualidade. Porém, o “amianto marrom” e o “amianto azul” representam menos de 2% do consumo mundial. ⁽⁴⁰⁾

A antofilita é constituída por fibras normalmente fracas e curtas, com alta resistência ao calor, aos ácidos e às substâncias químicas em geral. Suas principais jazidas encontram-se na Finlândia e no Brasil (Jiramataia, Alagoas), sendo que a extração desta variedade de asbesto, em Alagoas, encontra-se desativada e a Finlândia, que foi o maior produtor mundial, desativou sua extração em 1975. ^{(40),(44)}

A tremolita possui fibras longas, sedosas e pouco resistentes à tração. Esse tipo de amianto é encontrado junto a reservas de crisotila e de outros minerais anfibólios, sendo por isso de pouco valor comercial. ^{(40),(44)}

A actinolita, pouco encontrada na forma fibrosa e com fibras quebradiças, é quase desconhecida comercialmente, estando presente em pequenas quantidades nas reservas de amosita, crisotila e vermiculita, sendo menos freqüente nas duas últimas. ^{(40),(44)}

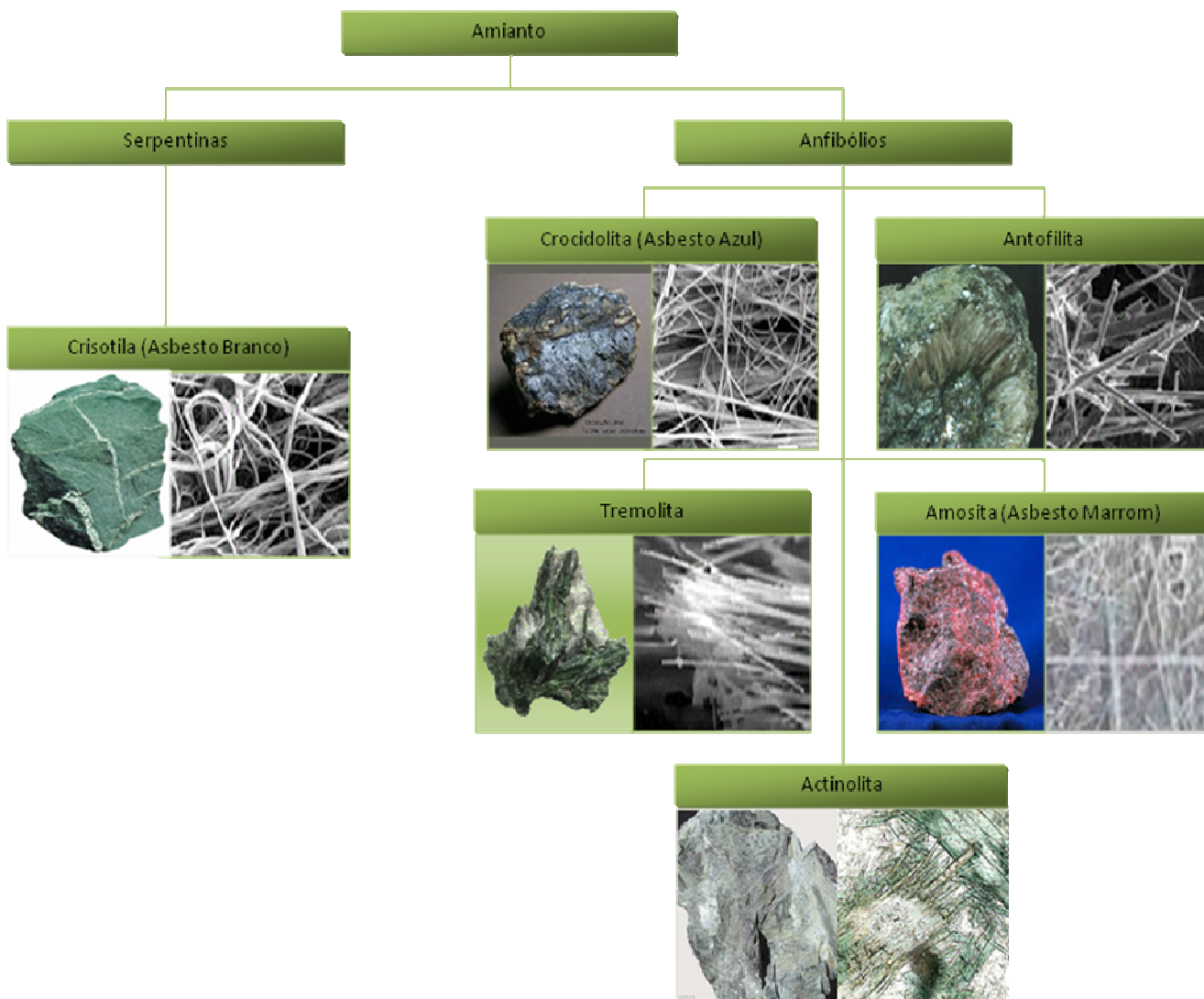


Figura 1 - Classificação e cristalografia dos seis tipos de amianto importantes comercialmente.

A exploração comercial do amianto começou em 1878, na região de Quebec, no Canadá, e seu consumo mundial, durante o período da II Revolução Industrial, aumentou abruptamente devido à sua ampla utilização industrial. ⁽¹³⁾

No Brasil, até o final da década de 30, todo o amianto consumido era importado. Nos anos 40, foram descobertas pequenas jazidas, como a de Pontalina, no sul de Goiás, São Félix no município de Poções na Bahia, São João no Piauí e Batalha em Alagoas. Porém, a produção de asbesto foi insuficiente para as necessidades do mercado brasileiro até 1962, quando foi descoberta a jazida de Cana Brava no município de Minaçu, em Goiás, cuja reserva estimada é suficiente para o consumo do mercado interno por aproximadamente cinquenta anos. ⁽⁴⁵⁾

A produção de asbesto, no Brasil, ganhou força, especialmente no setor de fibrocimento, quando já se iniciavam fortes pressões na Europa e Estados Unidos pelo seu banimento. Enquanto os países desenvolvidos se adiantavam para substituir o amianto, no Brasil e em outros países em desenvolvimento, novas fábricas eram instaladas, numa clara transferência de tecnologias e riscos para o Terceiro Mundo. Desde então, os países subdesenvolvidos se viram submetidos a uma intensa e agressiva campanha desencadeada pelos produtores de crisotila, particularmente de origem canadense, que buscam estabelecer que os danos causados pelo uso desta fibra seriam baixos.⁽²³⁾

Com 200 mil toneladas ao ano, o Brasil está entre os cinco maiores produtores mundiais.⁽¹⁰⁾ Diferentemente do Canadá, que exporta 98% do amianto produzido para os países em desenvolvimento, 70% do amianto brasileiro é utilizado no mercado nacional. Desses, 90% vão para as indústrias de construção, na fabricação de fibrocimento, especialmente na produção de telhas e caixas d'água.⁽¹³⁾ Mais da metade da produção do setor é controlado por duas empresas transnacionais, Saint-Gobain/Brasilit (francesa) e Eternit (ex-Suíça), que se juntaram numa *joint-venture*, a Eterbras, em cujos países de origem o amianto já está proibido há mais de uma década. Essas empresas multinacionais, em território brasileiro, anunciaram, em meados de 1999, que substituiriam o amianto de seu processo produtivo, acompanhando a decisão europeia e as exigências do mercado global.⁽²³⁾ Porém, como o amianto não é proibido no Brasil, ainda hoje, essas empresas o utilizam nos processos de trabalho.

No campo legislativo brasileiro, as ações são ainda tímidas, por parte do poder público, e sempre acompanhadas de debates inócuos e anúncios de efeitos catastróficos para a economia nacional caso o amianto seja banido, evidenciando claros interesses econômicos e fazendo com que as ações políticas de Saúde Pública e Social sejam sempre proteladas.⁽⁴⁶⁾

Até o momento, a proibição do asbesto foi aprovada e mantida em apenas três Estados brasileiros, Rio de Janeiro, Pernambuco e Rio Grande do Sul, uma vez que as leis de São Paulo e Mato Grosso do Sul foram derrubadas por decisão do Supremo Tribunal Federal. Apesar disso, de maneira lenta e gradual, em mais de 50 municípios brasileiros, especialmente os das regiões Sudeste e Sul, tramitam ou já há leis aprovadas proibindo o uso do amianto. Essas proibições são vitórias atribuídas aos movimentos sociais brasileiros, que resistem aos ataques de lobistas, pró-amianto nacionais e internacionais, e

de políticos, especialmente do Estado de Goiás, que querem manter a qualquer custo a exploração do amianto. ⁽⁴⁶⁾

Os movimentos anti-asbesto, no Brasil, buscam uma nova forma de fazer valer suas posições e de fazer política, contrapondo-se à ideologia do “uso controlado do amianto”. A luta pelo fim da utilização do amianto e das inúmeras doenças provocadas por ele configura-se em um movimento político comprometido com a transformação social na busca por uma sociedade mais justa, igualitária e saudável. ⁽²³⁾

I.4- Efeitos sobre a Saúde Humana

As observações sobre os efeitos nocivos do asbesto na saúde humana são tão antigas quanto os multiformes usos de suas fibras. Os problemas de saúde causados pela inalação de amianto foram reconhecidos apenas no início do século XX. A primeira doença descrita foi a asbestose, seguidos do câncer de pulmão, das alterações pleurais benignas e do mesotelioma de serosas, principalmente pleura e peritônio. ^{(14), (10)}

A denominação dessas doenças, segundo o Anexo II do Decreto 2.172/97, que regulamenta a Lei 8.213/91 da Legislação Brasileira, referente às “Doenças Profissionais ou do Trabalho” e seus respectivos códigos, segundo a Classificação Internacional de Doenças (CID), na sua 10ª Revisão (CID-10), estão apresentados no Quadro 3 a seguir. ⁽⁴⁷⁾

Quadro 3 – Doenças relacionadas ao amianto.

Agente Etiológico ou fator de risco	Doenças relacionadas ao Agente Etiológico ou fator de risco (Denominadas e codificadas segundo a CID-10)
Asbesto ou Amianto	Neoplasia maligna de estômago (C16.-) Neoplasia maligna de laringe (C32.-) Neoplasia maligna dos brônquios e do pulmão (C34.-) Mesotelioma de pleura (C45.0) Mesotelioma de peritônio (C45.1) Mesotelioma de pericárdio (C45.2) Placas epicárdicas ou pericárdicas (I34.8) Asbestose (J60.-) Derrame Pleural (J90.-) Placas Pleurais (J92.-)

Fonte: Centro de Vigilância Sanitária. ⁽⁴⁷⁾

Todos os tipos de asbesto são classificados pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) como sendo do Grupo 1, ou seja, definitivamente carcinogênicos para

os humanos ⁽⁴⁸⁾ e de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), não há nenhum limite seguro de exposição para o risco carcinogênico. ⁽⁴⁹⁾

No entanto, a OSHA (*Occupational Safety & Health Administration*) estabelece o Limite de Exposição Permitido (PEL) para fibras de asbesto de 0,1 fibra/ cm³, o mesmo valor do Limite de Exposição Recomendado (REL) estabelecido pelo NIOSH (*National Institute for Occupational Safety and Health*) e do Limite de Exposição (TLV-TWA) adotado pela ACGIH (*American Conference of Governmental Industrial Hygenists*). ⁽¹⁰⁾

No Brasil, o limite de tolerância (LT) para fibras respiráveis de crisotila, regulamentado pela NR-15, anexo 12 da Portaria n° 1 de 28/5/1991, é de 2,0 fibras/cm³, sendo estabelecido como “fibras respiráveis de asbesto” aquelas com diâmetro inferior a 3 micrômetros, comprimento maior que 5 micrômetros e relação entre comprimento e diâmetro superior a 3:1. ⁽⁴²⁾

As doenças associadas ao asbesto aparecem depois de muitos anos de exposição, e, portanto, há a necessidade de uma recuperação do histórico de contato do paciente com o composto. Geralmente, a história ocupacional sugestiva é o critério mais prático e útil de avaliar a exposição ocupacional ao asbesto. ⁽¹³⁾

Em termos anatomopatológicos, a asbestose é uma fibrose intersticial com presença de corpos asbestóticos (CA) ou fibras de asbesto relacionados à fibrose no interior do parênquima pulmonar, causando acúmulo de tecido conjuntivo, diminuindo a complacência pulmonar e, conseqüentemente, as trocas gasosas, podendo levar à morte. ⁽⁵⁰⁾

As fibras de asbesto parecem causar lesão tecidual através da estimulação de macrófagos alveolares por liberação de citoquinas de células inflamatórias e, também, através do estímulo a proliferação dos fibroblastos. Devido à sua durabilidade, as fibras podem estimular repetidamente os macrófagos por vários anos, sem que sejam degradadas. Isto explica a progressão contínua da doença após o interrompimento da exposição. ⁽⁵¹⁾

À medida que a doença progride, o processo fibrótico torna-se extenso e, por fim, envolve todo o pulmão, podendo perder sua arquitetura normal. Nos casos avançados, os pulmões tornam-se pequenos e rígidos, com fibrose macroscopicamente visível. ⁽⁵²⁾

Os sintomas clínicos da abestose não são específicos e caracterizam-se pela dispnéia de esforço, estertores crepitantes nas bases, baqueteamento digital, alterações funcionais e pequenas opacidades irregulares de predomínio basal ao radiograma de tórax, sendo seu diagnóstico baseado, inicialmente, nas alterações radiológicas e no histórico

ocupacional. ⁽¹⁴⁾ Alterações funcionais respiratórias podem ocorrer e incluem anormalidades nas trocas gasosas, um padrão restritivo e obstrutivo. ^{(13),(53)}

As alterações funcionais e os sintomas clínicos são mais precoces na asbestose que nas pneumoconioses nodulares, causadas por outros tipos de fibras como talco e fibras de vidro. ⁽¹⁴⁾

O período de latência entre a exposição e o aparecimento da doença é, normalmente, superior a dez anos e depende da intensidade da exposição do trabalhador, do seu ramo de atividade específica e das condições do ambiente de trabalho. ⁽¹⁴⁾

Manifestação de placas pleurais (PP) pode ocorrer após inalação de qualquer tipo de fibra e são muito comuns em casos de exposição ao asbesto, sendo consideradas marcadoras de exposição. ⁽⁵⁴⁾ As PP são espessamentos focais da pleura (pleura parietal, diafragmática e, menos comum mediastinal), que normalmente aparecem após um período de latência de 15 a 30 anos e geralmente são diagnosticadas com quadros clínicos de ausência de alterações pulmonares. A radiografia simples de tórax é o método mais utilizado no diagnóstico das PP, sendo possível também utilizar a tomografia computadorizada de Tórax com Alta Resolução (TCAR). ⁽⁵⁴⁾

O tempo médio para o aparecimento de câncer de pulmão e mesotelioma é de 20 e 35 anos, respectivamente. O câncer de pulmão ocorre com alta frequência entre os expostos ao amianto, seja na extração em minas ou em indústrias, que manipulam esta fibra, e o seu risco aumenta em 90 vezes, caso o trabalhador exposto também seja fumante, pois o fumo potencializa o efeito do asbesto como promotor de câncer de pulmão. Estima-se que 50% dos indivíduos que tenham asbestose venham desenvolver câncer de pulmão. ^{(55),(56)}

O mesotelioma é uma neoplasia maligna especificamente relacionada com a exposição ao asbesto que se desenvolve no mesotélio, a membrana que envolve os pulmões (pleura), o coração (pericárdio), o abdômen e seus órgãos (peritônio), cujo risco é dependente do tempo de latência e do tipo de fibra, sendo três vezes maior nos expostos aos anfíbios quando comparado aos expostos à crisotila. ⁽¹⁴⁾

Outras neoplasias malignas também têm sido associadas à exposição às fibras de asbesto, tais como os cânceres de laringe, orofaringe, estômago, colo-retal, e rim, porém, o mais frequentemente descrito é o câncer de laringe. ^{(40), (57)}

I.5- Penetração e deposição de poeira mineral nos pulmões

A deposição, absorção e retenção das partículas no trato respiratório seguem os princípios da dinâmica pulmonar e dependem diretamente do tamanho do material particulado. A Figura 2 esquematiza as classificações das partículas em frações inaláveis, torácicas e respiráveis e seus possíveis locais de deposição. ⁽⁵⁸⁾

A fração inalável corresponde a partículas menores que 100 micra de diâmetro, que ficam retidas na região nasal e na boca, pertencentes às vias aéreas superiores. A fração torácica é representada pelas partículas menores que 25 micra, que são capazes de penetrar além da laringe e a respirável, pelas partículas menores que 10 micra, as quais penetram na região alveolar, onde acontecem as trocas gasosas. ⁽⁵⁸⁾

O tamanho das partículas está diretamente relacionado com a quantidade de poeira mineral livre inalada e depositada, sendo de fundamental importância na avaliação do risco de desenvolver pneumoconioses. Além disso, fatores como concentração atmosférica de fração respirável de poeira, seu teor na forma cristalina, duração da exposição do trabalhador e a suscetibilidade individual, também, são determinantes. ⁽¹⁴⁾

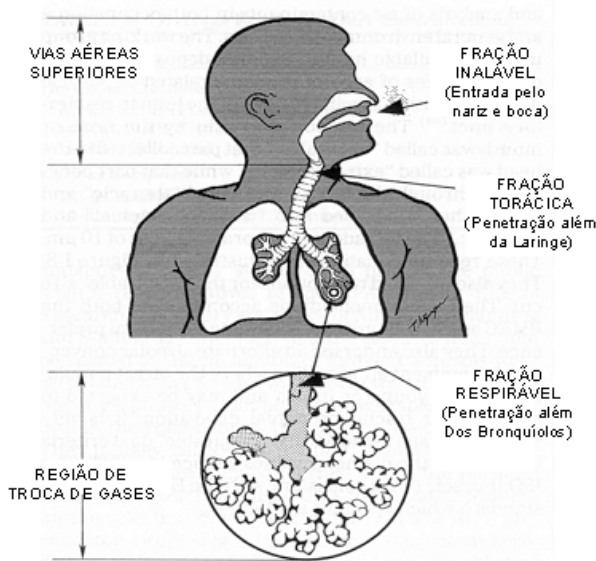


Figura 2 - Esquema das classificações das partículas em frações inaláveis, torácicas e respiráveis e seus possíveis locais de deposição.

O pulmão, normalmente, é isento de microorganismos patogênicos ou substâncias tóxicas, devido a mecanismos de defesa naturais, que eliminam imediatamente os agentes causadores de patologia do sistema respiratório. Os três principais mecanismos são: clearance nasal, limpeza traqueo-brônquica e limpeza alveolar. ⁽⁵⁹⁾

No mecanismo de clearance nasal, o nariz funciona como filtro natural, impedindo a passagem de partículas maiores que 10 μ , inclusive as que se depositam ao longo das vias aéreas superiores, através dos movimentos ciliares em direção ao exterior. Essa é a primeira barreira para a entrada de agentes estranhos e nocivos. ⁽⁵⁹⁾

Com a passagem de algumas partículas pelo nariz, inicia-se a limpeza traqueo-brônquica, que corresponde a uma reação na traquéia e brônquios, conduzindo o material para fora, em direção à orofaringe, utilizando movimentos musculares e ciliares na depuração. ⁽⁵⁹⁾

As partículas que chegam aos alvéolos são fagocitadas por macrófagos alveolares, cujo processo é denominado limpeza alveolar. Após a fagocitose, o material particulado inalado pode seguir 3 caminhos: permanecer “sequestrado” como partícula em fagossomas; migrar para a região de transporte mucociliar ou migrar para o interstício e circulação linfática. Nesse mecanismo é dado o primeiro passo para a liberação de um grande número de substâncias envolvidas no processo inflamatório. ⁽¹⁴⁾

I.6 – Resposta inflamatória do organismo a presença de fibras de amianto

Os processos patogênicos das pneumoconioses fibrogênicas, como a asbestose e a silicose, são relativamente semelhantes, sendo os mecanismos para liberação de determinadas substâncias químicas idênticos. A diferença fundamental está no tipo de poeira mineral inalada, e no caso do asbesto, por ser uma fibra, a ação de depuração do organismo torna-se mais complexa. ⁽⁵⁹⁾

A inalação de ambas as poeiras minerais é caracterizada pelo desenvolvimento de fibrose intersticial pulmonar intensa, envolvendo reação inflamatória, liberação de fatores quimiotáxicos, produção de colágeno e, conseqüente, formação de granuloma no pulmão. ⁽¹⁴⁾

A reação inflamatória local é caracterizada por aumento de fluxo sanguíneo, da permeabilidade capilar e vascular, atração de neutrófilos, macrófagos/monócitos e outras células de linhagem linfocitária, especificamente células T e B, que migram em direção a lesão. A partir da liberação de mediadores bioquímicos, dentre eles as citocinas, ocorre um aumento de proteínas de superfície celular e glicoproteínas conhecidas como moléculas de adesão, onde as células endoteliais participam ativamente desse processo. ⁽¹⁴⁾

Macrófagos pulmonares parecem desempenhar um papel central na fibrose pulmonar e na inflamação crônica asbesto-induzida. ⁽⁶⁰⁾ Anatomicamente, este grupo

heterogêneo de células pode ser distinguido de acordo com sua distribuição no pulmão, ou seja, de vias aéreas, alveolar, intersticial, intravascular, e pleural. Essas células específicas têm diferentes características morfológicas e, provavelmente apresentam diferentes respostas às interações com as partículas.

Macrófagos alveolares (MA) representam a primeira linha de defesa na região alveolar e sua expansão pulmonar é tipicamente caracterizada na exposição às fibras de amianto, tanto em seres humanos quanto em animais. Estudos realizados por Rom, W.M.(1987,1991) ^{(60),(61)}, encontram um aumento do número de MA ativos, no trato respiratório inferior de indivíduos cronicamente expostos a altas concentrações, e um aumento de 10 vezes no número de MA e um aumento de 3 vezes no número de macrófagos intersticiais no pulmão de ratos com 2 dias de exposição ao amianto, comparados com ratos não expostos.

Evidências *in vitro* sugerem que MA, ao contrário dos neutrófilos polimorfonucleares (PMN), que também aumentam na asbestose, podem reduzir lesões epiteliais asbesto-induzida por processos de reparo. ⁽⁶³⁾ Além disso, os MA fornecem dupla defesa do trato respiratório inferior, promovendo fagocitose e remoção de fibras inaladas e desencadeando eventos imunológicos locais, que podem ser protetores. ⁽⁶¹⁾

Outros estudos mostram que os MA ativos são fontes de citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento, com importante papel na patogênese da inflamação e do processo fibrótico nos pulmões. ⁽⁶²⁾

As citocinas são pequenos polipeptídeos mediadores da inflamação e podem desenvolver diversas atividades biológicas, como diferenciação e crescimento celular, inflamação, fibrogênese e homeostase, de acordo com o seu local de ação. ⁽⁶⁴⁾

Atualmente, as citocinas mais estudadas, envolvidas no processo das pneumoconioses, são Interleucina 1 beta (IL-1 β), Interleucina 6 (IL-6), Interleucina 8 (IL-8) e o Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α). Elas estimulam a produção de outras citocinas pro-inflamatórias e pro-fibrosantes e a quimiotaxia de células de defesa. A IL-6 é conhecida por promover a fibrogênese independente ou conjuntamente com o TNF- α . ⁽⁶⁵⁾

Pacientes com asbestose ou com história de exposição crônica ao amianto apresentam um aumento da expressão e da liberação de TNF- α por MA. ⁽⁶⁶⁾ O aumento de TNF- α está correlacionado com o desenvolvimento de asbestose em experimentos com animais. ⁽⁶⁷⁾

Fibras longas são, geralmente, consideradas mais cancerígenas e fibrogênicas que as fibras curtas de semelhante diâmetro e, conseqüentemente, estimularam uma maior liberação de TNF- α .⁽⁶²⁾

Os MA, também, estão envolvidos no recrutamento de neutrófilos para o pulmão, via liberação de IL-8. O aumento do número de neutrófilos está freqüentemente associado à lesão pulmonar, devido ao fato deles serem potentes produtores de substâncias oxigênio reativas e de enzimas proteolíticas, ambos com potencial para destruir os tecidos.⁽⁶²⁾

Células epiteliais pulmonares, também envolvidas no processo inflamatório, são capazes de produzir fatores quimiotáticos, como IL-8 e Proteína Quimiotática de Macrófagos 1 (MCP-1), através do contato direto com as fibras de amianto, sem a intervenção de MA.⁽⁶⁸⁾ Especificamente, após a passagem transepitelial, ocorre a ativação do sistema complemento local, gerando substâncias promotoras de quimiotaxia, que provavelmente agem como iniciadores dos eventos inflamatórios.⁽⁶²⁾

Outros compostos mediadores envolvidos no processo inflamatório são encontrados em soro e fluídos corporais. Dentre eles estão os compostos de anafilatoxina, cascata de complementos, cascata de coagulação, leucotrienos, prostaglandinas, mediadores lipídicos, neuropeptídeos, todos capazes, dentro das suas especificidades, de acelerar o processo de inflamação, tanto para repará-lo, quanto para mantê-lo e conduzi-lo a desfechos danosos para o organismo.⁽⁶⁰⁾

Estudos clínicos de imunidade celular, sobre a carcinogenicidade do amianto, também foram realizados. Células Natural Killer (NK) são uma das únicas populações linfocitárias com a capacidade de lisar rapidamente células tumorais, independente dos produtos genéticos do complexo de histocompatibilidade principal e acredita-se ser a primeira linha de defesa contra células cancerosas ou infectadas por vírus.⁽⁶⁹⁾

Para além da capacidade das fibras de amianto de aumentar substancialmente o risco de neoplasia pulmonar, estudos clínicos demonstram que células NK circulantes de sangue periférico, locais ou intersticiais de pacientes com asbestose, têm sua atividade prejudicada, indicando que tal supressão possa ter uma relação causal ou efeito multiplicador sobre o risco para o câncer de pulmão nesses indivíduos⁽⁷⁰⁾.

Ainda não é possível afirmar se esse déficit imunológico antecede ou é conseqüência de neoplasias e/ou desenvolvimento fibrótico. Porém, considerando a função das células NK na imunosupervisão de tumor, a supressão de sua atividade asbesto-induzida, indica um possível mecanismo de como a fibra exerce sua carcinogenicidade.⁽⁶²⁾

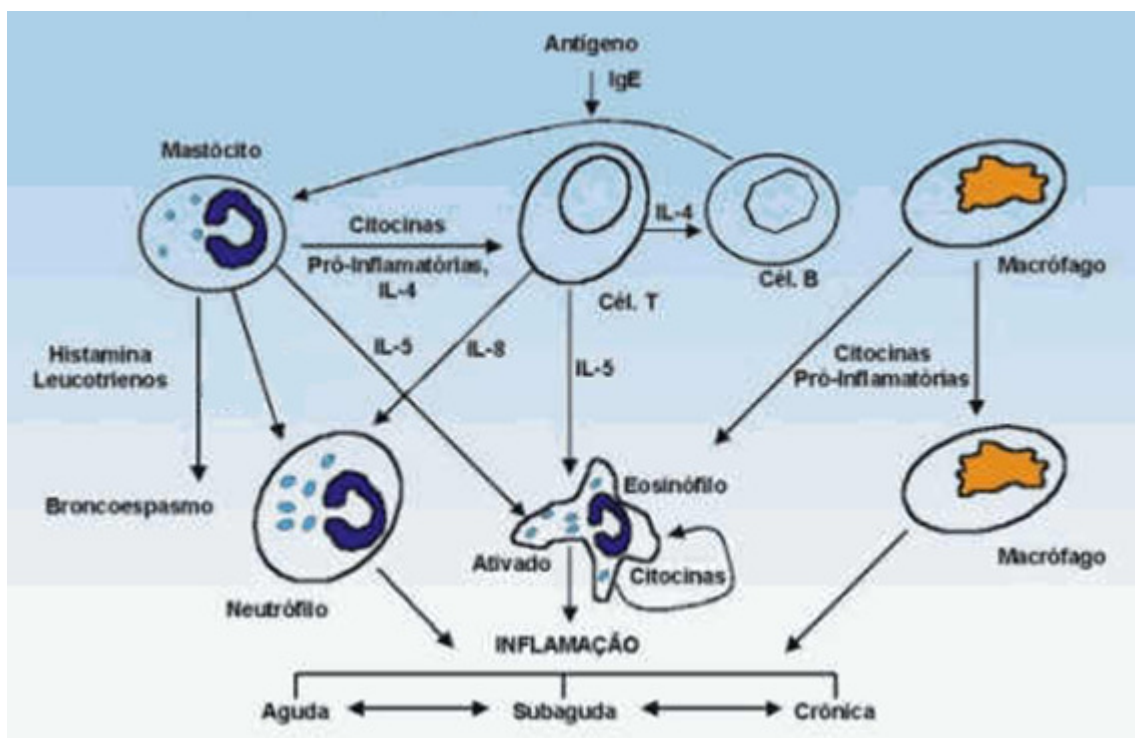
O amianto também está associado às alterações na imunidade humoral, manifestada pelo aumento dos níveis de imunoglobulinas séricas (IgA, IgG, IgM, IgE) e de mucosa (salivares) IgA e a presença de auto-anticorpos (anticorpos anti-nucleares, fator reumatóide) em indivíduos cronicamente expostos.⁽⁶²⁾

A presença de auto-anticorpos, a elevação de imunoglobulinas séricas, e a detecção de imunocomplexos séricos são indicativos de hiperatividade dos linfócitos B, em trabalhadores expostos. Estudos *in vitro*, com linhagens de células humanas, demonstram que tanto a crisotila quanto a crocidolita, podem complexar com linfócitos B imaturos e estimular a proliferação celular.⁽⁶²⁾

Embora os efeitos do amianto sobre a imunidade humoral sejam considerados hiperativos, uma depleção significativa da resposta imune celular ocorre em indivíduos expostos, em que células-B com atividades elevadas podem estar relacionadas à diminuição da atividade de células T supressoras (Ts). A intensidade funcional de células-T, na resposta fibrogênica da asbestose, diminui a gravidade da doença, ou seja, pacientes expostos, com deficiência na resposta de células-T, têm anormalidades fibróticas mais graves que aqueles com respostas normais, e doentes, com aumento da presença de linfócitos broncoalveolar, têm menos enfraquecimento fisiológico, que aqueles com maior número de neutrófilos e eosinófilos.⁽⁷¹⁾

Indivíduos expostos apresentam outras alterações relacionadas às células-T. As fibras de crisotila diminuem a liberação do fator de crescimento inibitório fibroblástico (FIGF) de linfócitos do sangue periférico *in vitro*, contribuindo para a acumulação excessiva de fibroblastos e subsequente fibrose.⁽⁷²⁾ De acordo com Rosenthal, G.J., *et al.* (1998),⁽⁶²⁾ células-T regulam os danos pulmonares, através da minimização de ambas as respostas inflamatórias e fibróticas, caracterizando um papel protetor dos linfócitos-T na asbestose.

A imunidade celular prejudicada pode representar um fator predisponente para a fibrose asbesto-induzida, porém mais estudos são necessários para melhor compreender a regulação do amianto e suas doenças associadas. A Figura 3 a seguir ilustra os mecanismos celulares envolvidos no processo fibrótico induzido pelas fibras de amianto nas vias aéreas pulmonares.



Fonte: Site <<http://www.tudoresidenciamedica.hpg.ig.com.br/estudar/consensofisiopatoasma.htm>>. ⁽⁷³⁾

Figura 3 - Mecanismos da imunidade celular envolvidos na inflamação das vias aéreas.

As respostas fisiopatológicas da asbestose, também, estão associadas com a formação de espécies oxigênio reativas (ERO) no trato respiratório inferior, tais como ânions superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e radicais hidroxil ($HO\bullet$). ⁽⁵⁹⁾

Os organismos aeróbios possuem sistemas de defesa antioxidante, que lidam com ERO produzidas nos diversos processos metabólicos da respiração aeróbia e da oxidação de substratos. ⁽⁷⁴⁾

As ERO são geradas diretamente pelo depósito de poeiras fibrogênicas no tecido pulmonar e, indiretamente, durante a fagocitose dessas partículas pelos macrófagos alveolares e neutrófilos polimorfonucleares. A produção elevada e contínua de ERO ou sua inadequada remoção pode suprimir o sistema de defesa antioxidante e resultar no estresse oxidativo, devido a um desequilíbrio entre os antioxidantes e oxidantes, em favor dos oxidantes, conduzindo a danos celulares no pulmão. ^{(74), (75), (76)}

As ERO e as citocinas pré-inflamatórias específicas ativam fatores transcricionais, que iniciam a transcrição de genes com múltiplas funções inflamatórias, incluindo citocinas (TNF, IL-4, IL10) e enzimas antioxidantes. ⁽⁷⁶⁾

Dentre os antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos mais comuns estão a superóxido dismutase (SOD), a glutatona peroxidase (GPx), a Glutathione S-Transferase (GST), a catalase (CAT) e a glutatona (GSH). Esses sistemas estão localizados em três compartimentos: o tecido pulmonar, fluido intersticial e os eritrócitos circulantes. ⁽⁷⁷⁾

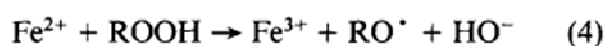
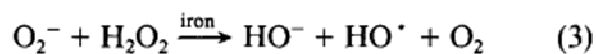
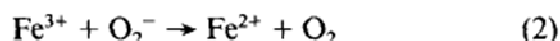
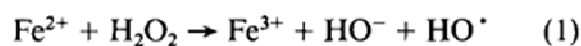
A SOD catalisa a destruição do radical ânion superóxido (O_2^-), convertendo-o em oxigênio e peróxido de hidrogênio. A ação desta enzima permite a eliminação do O_2^- mesmo em baixas concentrações. Existem duas formas de SOD no organismo, a primeira contém Cu^{2+} e Zn^{2+} como centros redox, presente no citosol, e a segunda contém Mn^{2+} como centro redox e está presente na mitocôndria.

A enzima catalase atua na dismutação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em oxigênio e água. ^{(74), (75)} A molécula de H_2O_2 isoladamente é praticamente inócuo, porém pode se difundir facilmente através das membranas celulares (nuclear e mitocondrial). Devido ao fato da célula possuir metais de transição, ocorre geração do radical hidroxil ($HO\bullet$) em seu interior, que pode causar danos ao DNA, RNA, às proteínas, lipídios e membranas celulares. ⁽⁷⁸⁾

A GSH e as GPx fazem parte de um grupo de enzimas que possuem selênio (selenocisteína) em sua estrutura, que atuam catalisando a dismutação do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, sendo que a glutatona opera em ciclos entre sua forma oxidada e sua forma reduzida na presença de GPx. ⁽⁷⁹⁾

A GST também faz parte do sistema de defesa antioxidante do organismo, auxiliando na resposta ao estresse oxidativo. ⁽⁸⁰⁾ De maneira geral, as GST catalisam a conjugação do grupamento glutatona (GSH) com substratos eletrofílicos. Esses substratos podem ser endógenos ou metabólitos de xenobióticos provenientes da primeira etapa (reações de fase I) do processo de metabolização de substâncias químicas realizado pelo organismo. ^{(81),(82)}

O amianto pode iniciar a formação das ERO, através de dois mecanismos principais: via reação catalisada pelo ferro como a reação de Fenton e de Haber-Weiss (Figura 4) ou via ativação da atividade de explosão respiratória inerente as células fagocitárias. ⁽⁸³⁾



Fonte: Kamp D.W., Graceffa P., Pror W.A., Weitzman S.A. (1992)⁽⁸³⁾

Figura 4 - Produção de radicais livres.

- (1) Reação de Fenton;
- (2) Redução do ferro pelo superóxido
- (3) Reação de Haber-Weiss (soma das equações 1 e 2)
- (4) Produção de radicais alcoolxil a partir de hidroperóxidos orgânicos

A própria fibra é rica em propriedades físicas e químicas que sozinhas podem iniciar a sua reatividade com substâncias circundantes no ambiente. Fibras de amianto são compostas de silicatos hidratados ricos em numerosas cargas negativas, com uma grande capacidade de formar complexos com metais de transição em sua superfície. O ferro é um metal de transição básico da superfície das fibras de asbesto e está presente em concentrações proporcionais à densidade de grupos funcionais ácidos.⁽⁶²⁾

As fibras de amianto podem facilmente penetrar nas células, incorporando o ferro do citosol, e iniciando a produção de radicais hidroxil, próximo a moléculas chaves intracelular e de membrana.

Estudos demonstraram que o amianto pode complexar fontes de ferro intracelular e o ferro adicional pode aumentar o tempo de vida da reação das fibras reativa. Corpos de asbestos, removidos de pulmão humano por autópsias, tem apresentado em sua superfície ferro redox-ativo, que é capaz de catalisar quebras simples na fita de DNA.⁽⁸⁴⁾

A ativação de macrófagos e neutrófilos polimorfonucleares, pelas fibras de amianto, induz a liberar ERO sob a forma de H_2O_2 e O_2^- , que catalisadas pelo ferro, podem ser convertidos em radicais hidroxil.

A interiorização incompleta das longas fibras de amianto, chamadas de fagocitose frustrada, ou a estimulação específica de enzimas produtoras de oxidantes, podem, em conjunto, contribuir para o aumento de metabólitos de oxigênio, liberados a partir de células fagocitárias, após exposição. A produção de ERO não é limitada às células fagocitárias, pois células epiteliais são capazes de liberar espécies oxigênio reativas.⁽⁶²⁾

Reações oxidativas iniciadas pelo amianto podem afetar macromoléculas celulares vitais, como DNA, lipídios e proteínas, levando a danos celulares e nucleares, a peroxidação lipídica, e a outros eventos relacionados com a morte celular. ^{(84), (85)}

Níveis moderados de estresse oxidativo podem iniciar a síntese de proteínas associadas às respostas fisiológicas ou fisiopatológicas celulares, como por exemplo, a modulação de eventos na cascata de transdução de sinal, através de efeito de fosforilação protéica. Radicais catalisados pelo ferro estão envolvidos na expressão e na secreção da TNF- α , em MA, e demonstram a ligação entre o estresse oxidativo induzido pelo amianto e a ativação de proteínas envolvidas na regulação das doenças pulmonares mediadas por essa fibra. ⁽⁸⁶⁾

Alguns estudos, sobre a toxicidade do amianto, envolvendo o papel do ferro e a produção de ERO, utilizaram o quelador de ferro desferroxamina. O tratamento de fibras de amianto, com desferroxamina, ou o tratamento de MA, com amianto em presença de desferroxamina, diminui acentuadamente a capacidade dessas fibras estimularem a produção de TNF- α , gerarem radicais hidroxil, e induzirem toxicidade celular, peroxidação lipídica e danos no DNA. ⁽⁸⁷⁾

Além disso, alguns sequestradores de radical hidroxil permeáveis a membrana, tais como dimetiltiourea (DMTU), tetra-metiltiourea (TMTU), e dimetil-sulfóxido, atenuam, significativamente, a expressão gênica de IL-8 e IL-6 em células epiteliais pulmonares. ^{(88), (89)}

A expressão e a transcrição gênica de citocinas, geralmente, estão associadas com a modulação da região do gene promotor, através de fatores de transcrição. Fator Nuclear (NF)- κ B é um fator de transcrição que controla a expressão gênica de diversas citocinas inflamatórias, incluindo TNF- α , IL-1 α , IL-8 e IL-6. Há crescentes evidências de que a fase redox-oxidativa da célula pode desempenhar um papel na ativação NF- κ B, que conduzem a um aumento da sobrevivência celular, da inflamação, e paradoxalmente, do aumento da regulação de enzimas antioxidantes. ⁽⁶²⁾

O amianto, também, pode atuar na sinalização celular como um iniciador e promotor no desenvolvimento de mesotelioma maligno (MM). Uma importante questão é se a carcinogenicidade das fibras de amianto ocorre através de sua interação direta com as células mesoteliais, através de mecanismos indiretos que envolvam o estresse oxidativo, ou ambos. ⁽⁹⁰⁾

Estudos relatam que a citotoxicidade das fibras crocidolita, em células pulmonares humana, tem relação direta com a mobilização de ferro e a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN). Além disso, foi demonstrado, também, que fibras de amianto causam a produção *in vitro* de lesões no DNA, por produção de ERO ou por prejuízos diretos nos cromossomos após a fagocitose das fibras.^{(90),(91)} As conseqüências de tais danos no DNA pode ser a perda de genes supressores tumorais, ativação de proto-oncogenes, ou a perda da regulação de fatores de crescimento.

O amianto, por interação direta com os receptores do fator de crescimento, ou por oxidação de proteínas, possivelmente fosfatases, causa estimulação de múltiplas vias de sinalização celular ligadas ao controle de crescimento anormal em células epiteliais pulmonares, mesoteliais, endoteliais e fibroblastos.⁽⁹⁰⁾

Estudos citogenéticos e moleculares indicam que MM resultam do acúmulo de inúmeros eventos genéticos somáticos, principalmente deleções. A ocorrência múltipla de deleções citogenéticas recorrentes sugere que a perda e/ou inativação de genes supressores tumorais são críticos para o desenvolvimento e progressão do mesotelioma.

Deleções de regiões específicas no braço curto (p) dos cromossomos 1, 3, e 9 e do braço longo (q) dos cromossomos 6, 13, 15 e 22 foram observadas em MM e a perda de uma cópia do cromossomo 22 é a mudança numérica mais comum. No entanto, as alterações genéticas críticas na gênese de mesotelioma são relativamente pouco conhecidas. A descoberta de alterações, em genes somáticos críticos em células de MM, e o entendimento de como cada um deles contribui para a patogênese desta malignidade pode contribuir na prevenção e estratégias terapêuticas mais eficientes.⁽⁹⁰⁾

I.7 - Instrumentos de Investigação Toxicológica

A Toxicologia Genética é a ciência que avalia os efeitos genotóxicos em potencial, que são considerados pré-requisitos importantes para o desenvolvimento de efeitos adversos a saúde como, por exemplo, os cânceres.⁽⁹²⁾

A genotoxicidade está relacionada à capacidade de um determinado agente físico ou químico em modificar a estrutura do DNA celular, resultando em alterações, como mutações gênicas, deleções, rearranjos cromossômicos e quebras simples e duplas.⁽⁹³⁾ O monitoramento genético de populações humanas expostas a potenciais carcinógenos é um sistema de aviso prévio para doenças genéticas e o câncer.⁽⁹⁴⁾

As alterações no genoma humano, decorrentes do ambiente, estilo de vida, dieta e de atividades ocupacionais, geram uma preocupação quanto à adoção de medidas de proteção da população. A associação entre propriedades genotóxicas de radiações e de substâncias químicas torna os testes genéticos úteis no rastreamento de agentes com potenciais oncogênico e mutagênico; na caracterização do risco; e na avaliação da relação dose-resposta e da exposição. Esses resultados geram informações sobre a incidência de efeitos na população exposta a determinadas condições específicas, podendo estabelecer possibilidades de proteção ou redução desses efeitos, sendo de extrema importância para a Saúde Pública. Com isso, torna-se cada vez mais urgente a utilização de métodos confiáveis, capazes de detectar e medir o dano no DNA. ⁽¹⁴⁾

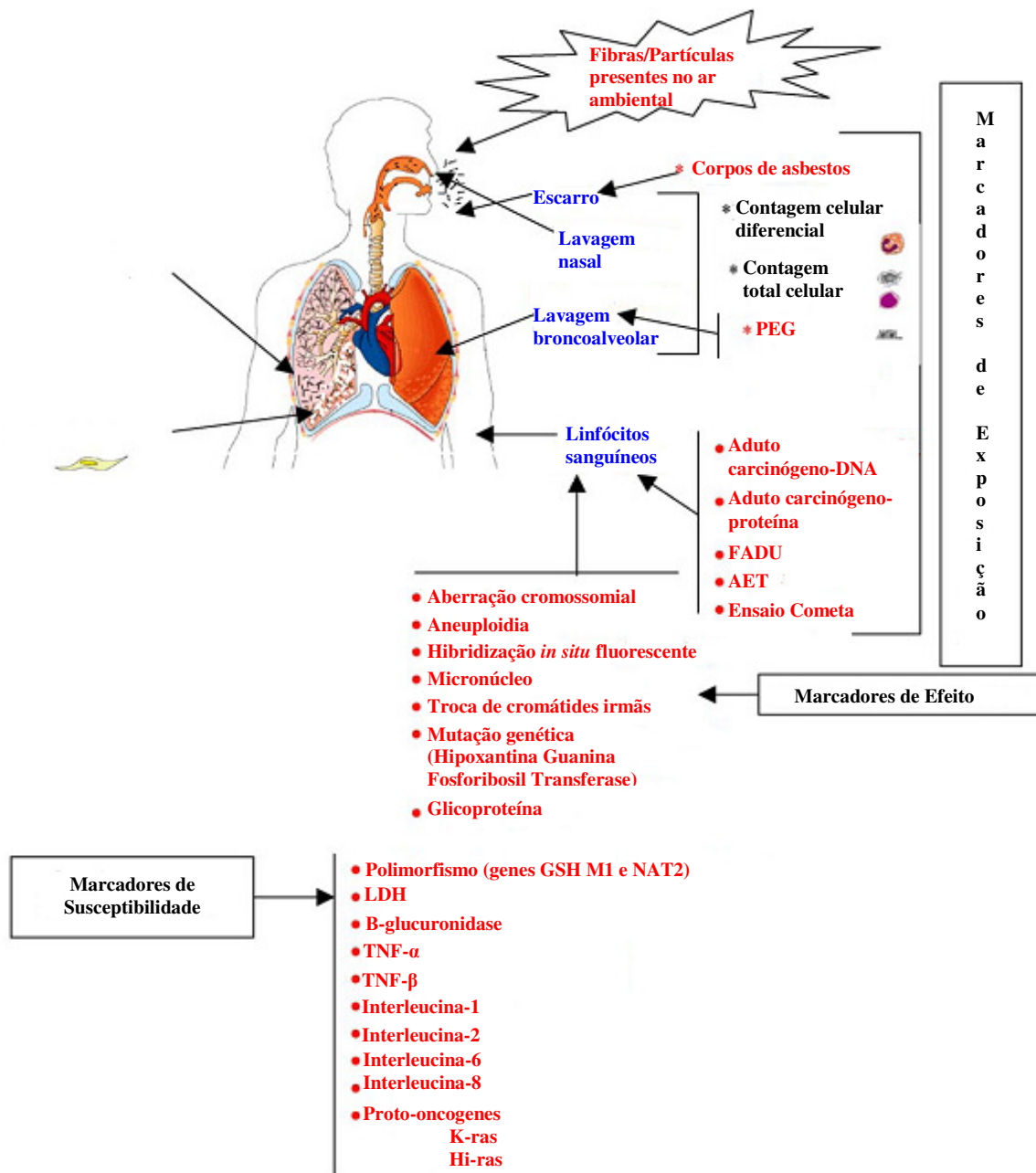
Os indicadores biológicos são ferramentas de fundamental importância na avaliação dos danos à saúde causados pela exposição às diversas substâncias químicas. Esses indicadores, associados às alterações bioquímicas e fisiológicas, precoces ou tardias, fornecem informações que são utilizadas para estimar o risco à saúde humana. ⁽¹⁴⁾

De modo genérico, os indicadores podem ser categorizados em três tipos principais: de exposição, de susceptibilidade e de efeito. Os indicadores de exposição são divididos em dose externa e dose interna e correspondem à expressão de um agente ambiental ou de seus metabólitos, respectivamente, nas diversas matrizes dos indivíduos. Os indicadores de efeito indicam alterações presentes no organismo e permitem avaliar o prognóstico da doença. E os indicadores de susceptibilidade caracterizam diferenças ou alterações genéticas que tornam os indivíduos mais ou menos propensos a determinadas doenças.

Os indicadores de exposição tradicionais, em especial os de dose interna, são químico-específicos e não traduzem o real potencial tóxico das substâncias químicas. Entretanto, os indicadores também podem avaliar a genotoxicidade das substâncias, podem não ser de forma específica, mas estabelecem fortes associações com a exposição a estas substâncias, devendo ser incluídos como uma ferramenta importante na avaliação de risco toxicológico. ⁽⁹⁵⁾

Diversos testes de curta-duração são utilizados na avaliação do perigo genético e esses modelos são categorizados pelos indicadores biológicos que avaliam, ou seja, mutação gênica, dano cromossômico ou lesão no DNA. Alguns desses testes são aberrações cromossomiais (AC), troca de cromátides irmãs, mutações pontuais e oncogênicas, micronúcleos (MN) e o ensaio cometa, sendo este último utilizado para avaliar lesões no DNA. ⁽⁹²⁾

A exposição ao asbesto altera várias vias metabólicas do organismo e, conseqüentemente, está relacionada a diversos indicadores biológicos, que estão ilustrados na Figura 5. ⁽⁹⁶⁾ Segundo Hattacharya, K. (2005),⁽⁹⁶⁾ o ensaio cometa é classificado como um indicador de exposição, enquanto que AC, troca de cromátides irmãs, micronúcleo são considerados indicadores de efeito, pois esses últimos representam desfechos que resultaram nos efeitos adversos a saúde, como por exemplo alterações funcionais de tecidos ou a órgãos, devido a danos cromossômicos, mutações genéticas ou alteração da homeostasia. Já as enzimas metabólicas, incluindo as do estresse oxidativo, como a catalase, SOD, GST e GPx, são consideradas indicadores de efeito, e seus respectivos genótipos e expressão gênica indicadores de susceptibilidade.



Fonte: Hattacharya, K. ,2005. ⁽⁹⁶⁾

Figura 5 - Exemplos de indicadores biológicos relacionados à exposição ao asbesto.

A técnica de AC baseia-se no estímulo da mitose pela fitohemaglutinina (PHA), seguido do seu bloqueio, na metáfase do ciclo celular, pela colchicina. Através desse teste é possível identificar alterações como deleções, aneuploidias, separação prematura centromérica (SPC). ^{(94), (97), (98)} A frequência de AC em linfócitos de sangue periférico pode servir não só como indicador relacionado à exposição a mutagênicos, como também indicador de danos genéticos com relevância no processo carcinogênico. ⁽⁹⁹⁾

Os micronúcleos são pequenos corpos contendo DNA envolvidos por membrana nuclear, localizados no citoplasma e separados do núcleo principal da célula. Os MNs somente são visualizados, nos linfócitos, após divisão celular e, por isso, essa técnica baseia-se no estímulo da mitose pela PHA, seguido do seu bloqueio pela citocalasina B (CtB), sem alterar a divisão nuclear, paralisando o ciclo celular na Telófase. O teste de micronúcleo (MN) distingue citologicamente, quebras ou perdas cromossômicas e é extensivamente usado em estudos de genotoxicidade de produtos químicos. ⁽¹⁰⁰⁾

Os efeitos do amianto em níveis cromossômicos têm sido comumente estudados utilizando biomarcadores de efeito, como aneuploidia, AC, teste de FISH, MN e perdas cromossômicas. Uma vez dentro da interfase celular após fagocitose, o amianto se acumula na região perinuclear, junto ao aparato mitótico das células. Estas observações levam à hipótese de que o amianto provoca aneuploidia, principalmente, por interferir no curso normal das mitoses. Um estudo *in vitro* realizado em linfócitos de fumantes expostos, a dois diferentes tipos de fibras de amianto, mostrou que a crocidolita, em fumantes, induzia mais MN e aneuploidia em comparação ao crisótilo ⁽¹⁰¹⁾. Outro estudo realizado em linfócitos *in vivo* de trabalhadores expostos ao amianto mostrou um aumento do número de MN. ⁽⁹⁶⁾

A técnica Ensaio Cometa é um teste de genotoxicidade para detecção de efeitos no DNA. Tais efeitos podem resultar em danos mutacionais, como aberrações cromossômicas estruturais, micronúcleos, mutações genéticas, que podem resultar de danos no DNA. ⁽⁹²⁾ Sendo assim, o teste do cometa não é utilizado para detectar mutações, mas sim lesões genômicas que, após serem processadas, podem resultar em mutações. Diferentes das mutações, as lesões detectadas pelo teste do cometa podem ser, também, utilizadas para estudos de reparo de DNA, trazendo informações importantes sobre a cinética e o tipo de lesão reparada, embora não possibilite inferir sobre a fidedignidade do processo de reparo. Uma vez que danos no DNA são freqüentemente célula- e tecido-específicos, uma técnica como a do Ensaio Cometa, que permite a detecção de danos e seu reparo em uma única célula, e conseqüentemente, em determinada subpopulação celular, é de extrema relevância para a avaliação de compostos genotóxicos. ⁽⁹²⁾

O teste do cometa vem sendo proposto para estudos de toxogenética devido a suas peculiaridades e vantagens quando comparado a outros testes para a detecção de substâncias genotóxicas. O Ensaio Cometa, também conhecido por SCG (Single-Cell Gel) ou SCGE (Single-Cell Gel Eletrophoresis) sob condições alcalinas, introduzido por Singh

et al ⁽⁴⁸⁾, é uma técnica eletroforética de alta sensibilidade, reprodutibilidade, simples e rápida para a detecção da presença de quebras de fita única de DNA e de lesões em sítios álcali sensíveis em células de mamífero *in vitro* e *in vivo*. Através dessa técnica é possível a avaliação de dano e de reparo do DNA em células proliferantes e não proliferantes, em nível individual, podendo ser empregado em amostras celulares extremamente pequenas. O ensaio Cometa tem amplas aplicações na toxicologia genética em testes de genotoxicidade *in vitro*, *in vivo*, no biomonitoramento ambiental e no monitoramento populacional humano. ⁽¹⁰²⁾

Estudo realizado por Topinka, J., *et al* (2006), ⁽¹⁰³⁾ avaliou parâmetros de genotoxicidade em ratos tratados e não tratados com fibras de amianto, sendo observadas quebras da fita de DNA, avaliadas por ensaio cometa, maiores em MA e em células epiteliais de pulmão em ratos tratados comparados com o controle.

Estudo utilizando células epiteliais pulmonares humanas expostas a altas concentrações de amianto (40 µg/cm²) por 1 h, apresentou uma clara indução de lesões no DNA, avaliadas pelo ensaio cometa. Outro estudo utilizando células mesoteliais humanas (Met-5A) tratadas com 1 a 4 µg/cm² por 0,5 a 48 horas, apresentou danos similares entre as diferentes concentrações, sendo que entre os tempos de exposição de 4 e 48 horas as diferenças não foram claras. Porém, os efeitos genotóxicos ocorreram na ausência de efeitos citotóxicos. Estes dados indicam que o efeito genotóxico das fibras de amianto pode ser detectado, através de ensaio cometa em células de mamíferos *in vitro*. ⁽¹⁰⁴⁾

Além disso, os efeitos genotóxicos e citotóxicos do asbesto podem ser demonstrados em outros sistemas de cultura celular, não sendo limitada a um determinado tipo de célula. ⁽¹⁰⁴⁾

Estudos realizados por Zhao, X.H (2006), ⁽¹⁰⁵⁾ compararam danos no DNA induzidos por amianto em linfócitos, entre 104 trabalhadores ocupacionalmente expostos e 101 trabalhadores não expostos da cidade de Quintão, China. Os resultados da intensidade de danos por Ensaio Cometa foram significativamente maiores para trabalhadores expostos comparados com a população controle.

A presença de alterações nos linfócitos serve como dosímetro interno, medindo a extensão em que determinado agente químico está associado a dano ao DNA dos tecidos e, de certa forma, indicando um potencial ao desenvolvimento de câncer. A aplicação da pesquisa de genotoxicidade em estudos populacionais com exposições a substâncias

clastogênicas pode aumentar o conhecimento do potencial carcinogênico das substâncias em humanos.

Indicadores enzimáticos do estresse oxidativo, também, são utilizados em estudos científicos que avaliam diversos tipos de pneumoconiose.

Altin *et al.* (2004) ⁽¹⁰⁶⁾ realizou um estudo populacional com 89 trabalhadores, com o objetivo de compreender melhor a relação entre a exposição ocupacional a poeira de carvoarias e as atividades das enzimas antioxidantes (SOD e GPx) e a concentração de malondialdeído (MDA, peroxidação lipídica) em sangue. Diferenças estatísticas significativas foram encontradas entre os grupos controle e o grupo com pneumoconiose em relação a MDA, SOD e GPx, obtendo níveis de MDA mais altos, enquanto que as atividades de SOD e GPx diminuíram com o aumento do grau da doença.

No entanto, o estudo realizado por Nadif, R., *et al.* (1998), ⁽¹⁰⁷⁾ em 240 trabalhadores de carvoarias na França, separados em grupos expostos a baixa e alta concentrações de poeira, encontrou correlações positivas e significativas entre a catalase e glutatona peroxidase de acordo com a exposição à poeira, enquanto que em relação a superóxido dismutase encontrou uma correlação negativa. Comparando-se as enzimas antioxidantes e a severidade da doença, a atividade da catalase mostrou uma associação positiva, enquanto a atividade da SOD apresentou uma associação negativa.

Um estudo realizado por Evelo *et al.* (1993) ⁽¹⁰⁸⁾ observou uma diminuição da atividade da GST em trabalhadores de carvoarias em estágio inicial de pneumoconiose, também como uma diminuição da atividade da GPx e a concentração de GSH, podendo estes, terem sido originados de danos causados pelo ERO.

Ainda pouco se conhece sobre a expressão de enzimas antioxidantes relacionadas ao asbesto. Estudos realizados com linhagens de células de mesotelioma resistentes indicam não apenas elevados níveis de MnSOD, mas também atividades elevadas significativamente para catalase, GST e altas concentrações de glutatona.

Esta dissertação de mestrado faz parte do projeto “Avaliação e gerenciamento de risco em populações expostas ao amianto e fibras alternativas”, cujo objetivo é fornecer subsídios para as ações de Vigilância em Saúde e Ambiente relacionadas ao amianto no meio macro-ambiental e no meio biológico e de prevenção na questão das fibras alternativas.

II - OBJETIVO

O objetivo deste estudo é avaliar alterações em parâmetros enzimáticos do estresse oxidativo e os danos genotóxicos decorrentes de exposição ao asbesto, em trabalhadores expostos e não-expostos, atendidos no Ambulatório de Pneumopatia Ocupacional do Centro de Estudo da Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana (CESTEH) da Escola Nacional de Saúde Pública (ENSP/FIOCRUZ).

Objetivo específico

- Implementação da metodologia de genotoxicidade de Ensaio Cometa no Laboratório de Toxicologia do CESTEH;
- Aplicação do teste de Ensaio Cometa no universo amostral;
- Determinação das atividades das enzimas do estresse oxidativo Catalase (CAT) e Glutathione S-Transferase (GST) no universo amostral;
- Associação dos sinais clínicos da doença asbestose com os parâmetros da resposta ao estímulo oxidativo e com os resultados da avaliação genotóxica por ensaio cometa;
- Associação das variáveis: hábito de fumar, idade e tempo de exposição, obtidas através de questionário, com os resultados do ensaio cometa, parâmetros do estresse oxidativo e da avaliação clínica.

III- PROPOSTA METODOLÓGICA

III.1 - Desenho de estudo

A população deste estudo foi composta por famílias de trabalhadores expostos ao amianto, advindos de diversas empresas que utilizam as fibras de amianto em seu processo de produção do Estado do Rio de Janeiro, incluindo as esposas dos trabalhadores que tiveram contato com as fibras, e de trabalhadores não expostos ao amianto, composto de técnicos laboratoriais do Laboratório de Toxicologia do CESTEH/ENSP/FIOCRUZ. Ambos os grupos de trabalhadores foram atendidos pelo Ambulatório de Pneumopatia Ocupacional do CESTEH/ENSP/FIOCRUZ, localizado em Manginhos na cidade do Rio de Janeiro. Os trabalhadores, de ambos os sexos, foram selecionados aleatoriamente no banco de dados do Ambulatório de Pneumopatia Ocupacional, sendo todos com idade superior a 18 anos.

O grupo exposto ao asbesto foi subdividido em dois subgrupos: exposto doente, ou seja, os que apresentavam asbestose, e exposto não doente, que não apresentavam a doença. Para tanto, foi considerado trabalhador exposto doente, aquele com RX de tórax $\geq 1/0$, e exposto não doente, com RX de tórax $=0/0$, estando de acordo com as normas da OIT/2000.⁽¹⁰⁹⁾

Os critérios de inclusão adotados foram: idade superior a 18 anos, de ambos os gêneros, atendidos no Ambulatório de Pneumopatia Ocupacional, através de livre demanda, com exposição ocupacional ao amianto ou não (grupo Laboratório) e participação voluntária do estudo através da assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Como critério de exclusão foi adotado o teste tuberculínico (PPD de Mantoux) positivo para os voluntários. As análises laboratoriais foram realizadas no Setor de Indicadores Biológicos do Laboratório de Toxicologia do CESTEH.

Após o consentimento em participar do estudo, todos os voluntários seguiram as seguintes etapas (Figura 6): responder a um questionário de sinais e sintomas pulmonares e características de suas atividades profissionais e de exposição a substâncias químicas no ambiente de trabalho; realização de PPD; exame clínico; espirometria; radiografia e, por fim, coleta das amostras de sangue para as análises de Ensaio Cometa e de resposta ao estresse oxidativo.

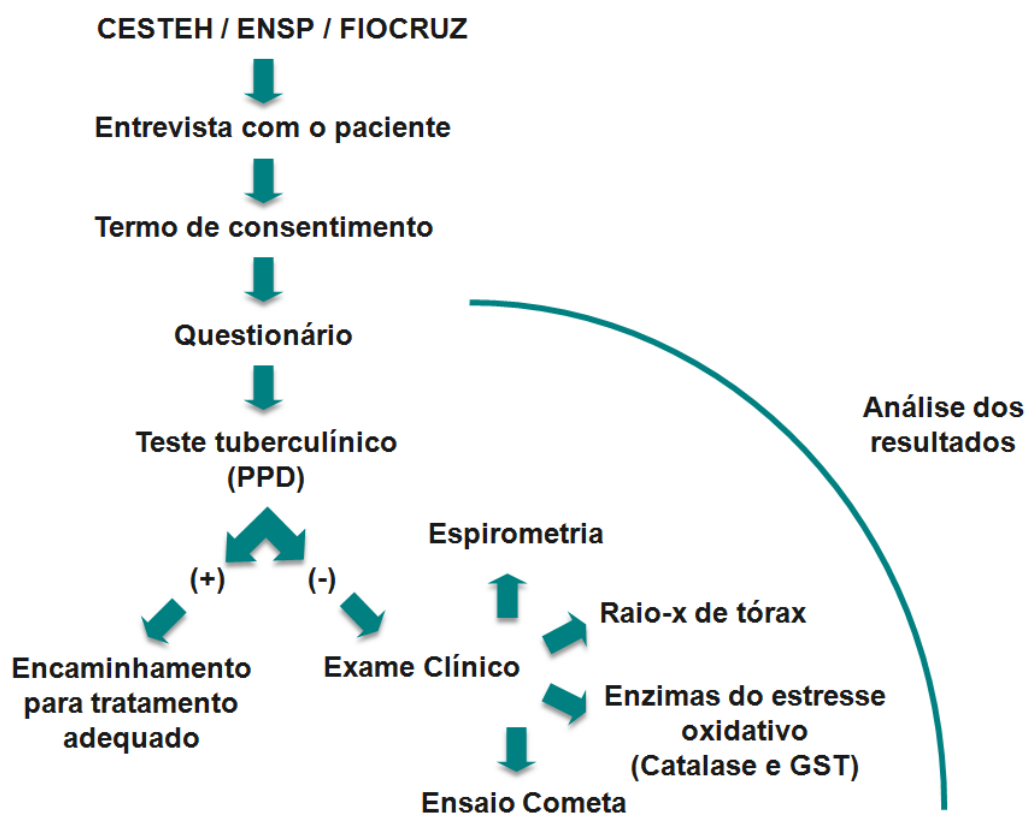


Figura 6 - Esquema das etapas iniciais do projeto durante o período de sua realização.

III.2 - Procedimentos de avaliação física e clínica

Exame físico e entrevista

Os exames físicos e a entrevista consistiram de análise de dados clínico e sócio-demográficos, com a finalidade de avaliar o grau de acometimento dos indivíduos e a evolução clínica dos sintomas, além de identificar outras co-morbidades, como alcoolismo, diabete mellitus, hepatite, doenças auto-ímmunes, insuficiência renal, entre outras.

Exames radiográficos do tórax

A técnica radiológica utilizada encontrava-se dentro dos padrões da Organização Internacional do Trabalho (OIT) de 1980 ⁽¹⁰⁹⁾. Foram consideradas alteradas as radiografias em que a média da leitura era maior que 1/0. As radiografias foram classificadas quanto à profusão de lesões e o tipo de lesão no parênquima pulmonar e divididas em categorias de 0 a 3 (Quadro 4), conforme a gravidade da doença.

Quadro 4 - Classificação das leituras de raios-x em categorias de 0 a 3, conforme as normas da OIT/2000.

Categoria 0	→	raios-x com leitura 0/-, 0/0 e 0/1
Categoria 1	→	raios-x com leitura 1/0, 1/1 e 1/2
Categoria 2	→	raios-x com leitura 2/1, 2/2 e 2/3
Categoria 3	→	raios-x com leitura 3/2, 3/3 e 3/+

Teste tuberculínico cutâneo

O teste tuberculínico (PT) foi feito com 5 UT de PPD-S pela técnica de Mantoux, de acordo com o Centers for Disease Control (CDC, 1994), com leitura entre 48 e 72 horas. Os resultados da leitura foram registrados, segundo os critérios dos “CDC” e Ministério da Saúde (2002) em: teste tuberculínico positivo e PT negativo. O teste tuberculínico positivo foi considerado aquele com endureção ≥ 10 mm (forte reator), enquanto o PT negativo foi considerado aquele com endureção < 10 mm (fraco reator ou não reator)⁽¹¹⁰⁾. O método utilizado para a leitura foi o palpatório e, no momento da leitura, os indivíduos com PT positivo foram indagados quanto à presença de sintomas respiratórios prolongados e febre, e encaminhados para tratamento adequado. Os indivíduos com PT negativo realizaram, após uma semana, um segundo PT.

Teste espirométrico

O teste espirométrico foi realizado de acordo com a técnica orientada pela American Thoracic Society (1997),⁽¹¹¹⁾ que consiste numa expiração forçada até o limite do volume de reserva expiratória, após inspiração máxima. A espirometria avalia a função ventilatória, refletindo dados sobre distensibilidade ou resistência elástica do aparelho respiratório e sobre a resistência ao fluxo aéreo. É um teste que auxilia na prevenção e permite o diagnóstico e a quantificação dos distúrbios ventilatórios, tendo um importante papel na pneumologia ocupacional.

Os indivíduos do grupo Laboratório não passaram pelos procedimentos dos exames físico, radiográfico do tórax, teste tuberculínico cutâneo e espirométrico.

III.3 - Coleta das amostras de sangue

Amostras sanguíneas foram coletadas por profissional habilitado em 3 tubos a vácuo, contendo anticoagulante. Um dos tubos foi direcionado imediatamente para a realização do hemograma completo e os outros dois tubos foram direcionados às análises de Ensaio Cometa e das enzimas CAT e GST. Para a realização do Ensaio Cometa, a amostra sanguínea foi imediatamente submetida aos procedimentos de análise do teste, sendo a quantidade de sangue restante no tubo acondicionada sob refrigeração, juntamente com o segundo tubo coletado até o momento das análises das enzimas do estresse oxidativo.

As análises de hemograma completo foram realizadas no Ambulatório da ENSP e a parte experimental do trabalho foi realizada no Laboratório de Toxicologia do CESTE/ FIOCRUZ. As metodologias executadas foram padronizadas, de acordo com critérios e testes de acuidade e precisão analíticas.

III.4 - Determinações dos parâmetros do estresse oxidativo

III.4.1 - Catalase (CAT)

A determinação da atividade da enzima Catalase (CAT) em eritrócitos humanos foi realizada baseada no método de Aebi, H. (1984),⁽¹¹²⁾ que tem por finalidade quantificar a atividade da enzima CAT através da decomposição de 1 mol de H₂O₂ a uma D.O em 230nm.

Soluções utilizadas

- Solução de tampão fosfato [fosfato de potássio monobásico 50mM; fosfato de sódio dibásico 50mM, pH 7,0];
- Solução de peróxido de hidrogênio [30% de H₂O₂ em solução de tampão fosfato (50mM, pH 7,0)];
- Solução de cloreto de sódio isotônico [0,9% NaCl em água destilada].

Procedimentos

Nota: As amostras de sangue (coletadas em tubos heparinizados) devem ser mantidas a 0°C (banho de gelo) durante toda a elaboração das análises, a serem realizadas no mesmo dia de coleta das amostras para o não comprometimento da atividade enzimática.

Para cada amostra, separa-se uma alíquota de 2mL em tubos e centrifuga-se as amostras por 10 minutos a 3500 rpm (1591 G) a 4°C. Posteriormente, despreza-se o plasma (sobrenadante). Uma alíquota contendo 500µL de sedimento de eritrócitos de cada amostra é transferida para outro tubo de centrífuga refrigerada, onde se acrescenta 5mL de cloreto de sódio (solução salina) para a lavagem dos eritrócitos. Homogeneízam-se os tubos por 15 segundos e, em seguida, centrifuga-se as amostras por 10 minutos a 3500 rpm (1591 G) e a 4°C. Esse processo de lavagem é repetido por mais 2 vezes. Após as 3 lavagens, transfere-se 50µL do sedimento de eritrócitos para um tubo de vidro e adiciona-se 200µL de água deionizada, para a hemólise dos eritrócitos, formando assim o hemolisado concentrado. Este procedimento é realizado em triplicata. Posteriormente, homogeneízam-se os tubos por 20 segundo, sendo os mesmos mantidos em banho de gelo até o momento da leitura no espectrofotômetro.

Momentos antes da análise espectrofotométrica, preparam-se a solução de peróxido de hidrogênio e o hemolisado diluído, através da adição de 5µL do hemolisado concentrado e 2,5mL de tampão fosfato. A leitura das amostras transcorre no modo cinético por 15 segundos a um comprimento de onda de 230nm.

Para a leitura do branco, adiciona-se na cubeta, 2 mL do hemolisado diluído e 1 mL de tampão fosfato e para a leitura das amostras, adicionar na cubeta, 2 mL do hemolisado diluído e 1 mL de peróxido de hidrogênio.

Cálculos

Não é possível definir uma unidade internacional para a catalase, portanto recomenda-se o uso de uma constante de reação de 1ª ordem (k). Esta constante pode ser relacionada com o teor de hemoglobina presente na amostra (k/g Hb), que serve como uma medida da atividade específica da catalase em eritrócitos. Os cálculos de CAT são baseados nas seguintes fórmulas:

$$k = (2,3/15) (\log A1/A2)$$

$$k = 0,153 (\log A1/A2) \quad (\text{segundos}^{-1})$$

$$k/\text{mL} = ka$$

$$k/\text{g Hb} = k/\text{mL} (1000/b) = 0,153 (a/b)(\log A1/A2)$$

Onde,

A1 = absorvância no t=0.

A2 = absorvância no t=15 segundos

a = Fator de diluição

b = teor de hemoglobina (Hb) em grama/litro (g/L)

Nota: Para o cálculo da atividade da enzima catalase há a necessidade do valor do teor de hemoglobina nos eritrócitos. Portanto, utilizou-se exame de hemograma completo recente (até 3 meses) ou solicitou-se o pedido do exame através do laboratório.

III.4.2 - Glutathione S-transferase

A determinação da atividade enzimática da GST foi realizado por espectrofotometria UV-Visível, utilizando comprimento de onda de 340nm e 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno como substrato universal, de acordo com o método descrito por Habig *et al* (1981).⁽¹¹³⁾

Reagentes

- Solução de cloreto de sódio isotônico [0,9% NaCl em água destilada]
- Tampão Fosfato 0,1M [KH₂PO₄ 0,1M; K₂HPO₄ 0,1M; pH=6,5].
- Solução de Etanol (EtOH) 95% (v/v)
- Solução de CDNB 0,3M, preparada em solução de EtOH 95%
- Solução de GSH 0,3M, preparada em Tampão Fosfato 0,1 M.

Procedimentos

Lavagem de Eritrócitos

Logo após a coleta de sangue, transfere-se, para um novo tubo de ensaio, uma alíquota contendo 2 mL de sangue total e centrifuga-se a amostra a 3000 rpm (1169 G) por 30 minutos. Em seguida, retira-se 500µL de eritrócitos (sedimento), sendo transferido para

um novo tubo de ensaio, onde adiciona-se 5 mL de NaCl 0,9 %, para a lavagem dos eritrócitos.

Homogeneiza-se cada tubo por 15 segundos, e posteriormente, centrifugam-se os mesmos a 3000 rpm (1169 G) por 10 minutos. Ao término da centrifugação, retira-se a parte sobrenadante, com o auxílio de uma pipeta, tomando cuidado para não aspirar eritrócitos precipitados. Os procedimentos de lavagem de eritrócitos são realizados 3 vezes.

Após a terceira lavagem, transferem-se duas alíquotas de 50 µL de eritrócitos de cada amostra para dois novos tubos, onde adiciona-se 1450µL de Água Milli-Q e, em seguida, homogeneiza-se por 30 segundos, ocorrendo a hemólise.

No momento da leitura, prepara-se a mistura de PBS + GSH + CDNB em um tubo, conforme Tabela 1, homogeneiza-se a mistura, sendo transferida, em seguida, para a cubeta. Para o branco, adicionar 100µL de PBS no lugar do hemolisado e para a amostra, adicionar o hemolisado diretamente na cubeta, fazendo 5 ciclos de aspiração com a pipeta, para homogeneizar. A leitura das amostras foi realizada em modo cinético, a 340 nm, durante 1 minuto.

Tabela 1 - Quantidade de reagentes para o branco e amostras.

Reagentes	Branco	Amostra
PBS (mL)	2,8	2,7
GSH (µL)	100	100
CDNB (µL)	100	100
(Hemolisado)	-	100

Cálculo

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

Onde,

Fator de extinção molar = 9,6

Volume do hemolizado utilizado = 0,1 mL

Volume final na cubeta = 3,0 mL

FD = fator de diluição

III.5 - Metodologia do Ensaio Cometa

Soluções Utilizadas

- Solução de Lise celular [NCl 2,5 M; Tris-HCl 10 mM; EDTA 100mM; Lauril Sulfato de sódio 1%; pH 10]
 - Tampão de Eletroforese [300mM / 1mM EDTA]
 - Tampão de Neutralização [Tris 0,4 M]
 - Solução de Brometo de etídeo [40ug/mL]
 - Agarose [1,5%]
 - Agarose Low Melting Point (LMP) [0,5%]
 - Solução A [MMS 80mM]
 - Solução B [MMS 0,8mM]
 - Solução C [MMS 0,4mM]
- } Soluções Controle Positivo

Procedimentos

Preparo das lâminas

Inicialmente, as lâminas foram lavadas com etanol absoluto e, em seguida, mergulhadas em agarose 1,5% a 60°C. Posteriormente, limpa-se a parte inferior das lâminas e deixa-se a agarose gelificar na parte superior, horizontalmente.

Preparo das amostras controle

- 1- Controle celular – adiciona-se 250uL de sangue total em tubo *Eppendorf*
- 2- Controle solvente – adiciona-se 50uL de tampão PBS a 200uL de sangue total em *Eppendorf*
- 3- Controle positivo MMS 1 – adiciona-se 50uL de solução B a 200uL de sangue total em tubo *Eppendorf*, obtendo-se concentração final de MMS = 16×10^{-5} M (0,16mM)
- 4- Controle positivo MMS 2 – adiciona-se 50uL de solução C a 200uL de sangue total em tubo *Eppendorf*, obtendo-se concentração final de MMS = 8×10^{-5} M (0,08mM)

Incuba-se todas as amostras controle junto com as amostras-teste por 2 horas a 37+/-1°C

Preparo das células

Marca-se cada lâmina com o código de identificação do indivíduo e/ou das soluções controle. Em seguida, homogeneiza-se o sangue invertendo o tubo *vacutainer* várias vezes.

Transfere-se, com o auxílio de um pipetador automático, uma alíquota de 10uL de sangue total ou de solução controle para tubo *Eppendorf* e adiciona-se, lentamente, 120uL de agarose LMP, previamente aquecida à 37°C, homogeneizando suavemente à suspensão de células.

Posteriormente, espalha-se a suspensão em uma lâmina contendo uma película de agarose à 1,5%, que foi preparada na etapa anterior, e coloca-se sobre ela uma lamínula de 24x60mm, antes que a suspensão de células na agarose se solidifique. Prepara-se 5 lâminas por amostra.

Em seguida, as lâminas são colocadas em uma bandeja e deixadas na geladeira por 5 minutos. Após o tempo determinado, retira-se, cuidadosamente, de cada lâmina as suas lamínulas e, subseqüentemente, acondiciona-se às lâminas, em 130mL de solução de lise, num recipiente tipo Coplin, revestido externamente com papel laminado. A partir desta etapa, evita-se a irradiação de luz direta, para prevenir lesões adicionais ao DNA.

As lâminas são guardadas na geladeira por, no mínimo, 1 hora e, no máximo, 24 horas e, após este período, são arrumadas em fileiras ao lado do anodo (+) da cuba de eletroforese. Adiciona-se, cuidadosamente, a solução de eletroforese à 4°C, pelas laterais da cuba, o suficiente para cobrir as lâminas, deixando-as em contato com o tampão de corrida, por 25 minutos, para possibilitar o desenovelamento do DNA e assim poder expressar as diferentes classes de lesões álcali-lábeis.

Ajusta-se a fonte de eletroforese nas condições de operação (25v/300A) e procede-se a corrida de eletroforese, por 25 minutos. Ao término da corrida, retira-se, cuidadosamente, as lâminas da cuba, lavando-as com tampão de neutralização, etanol absoluto e água destilada, 3 vezes com intervalos de 5 minutos, para cada lavagem.

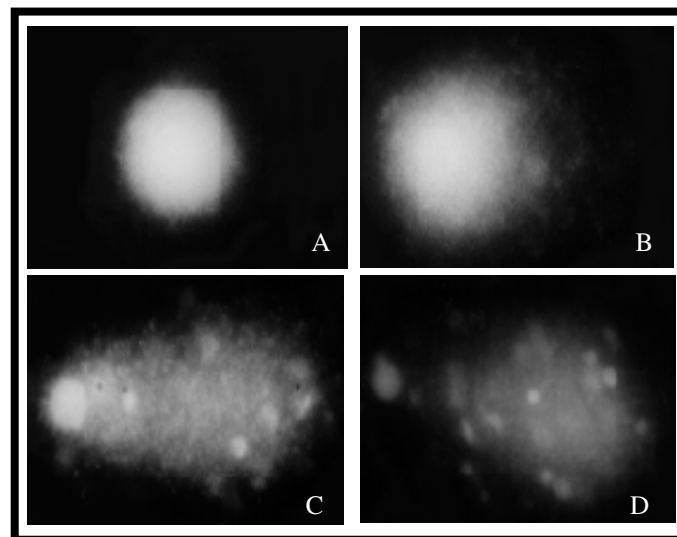
Deixam-se as lâminas secarem em contato com o ar, à temperatura ambiente, por 24 horas ou mais, caso haja necessidade. As lâminas secas são guardadas na sua embalagem original e deixadas à temperatura ambiente.

Coloração das lâminas

Com o auxílio de uma pipeta automática, distribui-se 40uL de solução corante de brometo de etídeo (40ug/mL) em cada lâmina, cobrindo-a, posteriormente, com a lamínula. Imediatamente após, observa-se ao microscópio de fluorescência.

Análise dos cometas ao microscópio

As lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência, equipado com lentes oculares e lentes objetivas planocromáticas de 10X e 40X e com filtro de excitação de 560nm (faixa verde) e um filtro de barreira de 590nm. Os cometas foram localizados com a objetiva de 10X e após a sua visualização, os nucleóides examinados, com a objetiva de 40X. Os cometas foram analisados e suas morfologias observadas, *scanneando* a lâmina da esquerda para a direita. Cada cometa foi classificado visualmente, de acordo a intensidade da cauda, como mostra a Figura 7 e, ao final das análises, fazendo-se o somatório das classificações das caudas dos cometas encontrados, podendo o total de UA variar entre zero e 150.



Fonte: Da Silva, J. *et al* (2000)⁽¹¹⁴⁾

Figura 7 - Fotografia da classificação do ensaio cometa.

A- classe 0, sem danos; B- classe 1; C- classe 2; D- classe 3; dano máximo.

III.6 - Análise dos resultados

As análises laboratoriais foram realizadas as cegas. Os técnicos laboratoriais não tiveram acesso aos códigos de identificação das amostras clínicas. A análise estatística realizada nas comparações entre dois grupos foi o Teste t-Student. A análise multivariada (ANOVA) seguida do teste de Bonferroni foi utilizada para comparar médias de variáveis contínuas com distribuição normal ou com N significativo. A medida do grau de relação linear, entre bivariáveis quantitativas, foi realizada através da análise de coeficiente de correlação de *Pearson*. A análise da sensibilidade e da especificidade dos indicadores biológicos foi avaliada através de curva ROC (*receiver operating characteristic*). Em todos os testes, o nível de significância adotado foi o de 5%. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa SPSS 13.0.

IV – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Participaram deste estudo 78 voluntários, que foram divididos em dois grupos, conforme suas atividades laborais. O grupo exposto foi constituído por trabalhadores ao amianto de diversas empresas localizadas no município do Rio de Janeiro, estando entre as principais a Eternit e a Asberit. O outro grupo foi composto por trabalhadores não expostos ao amianto e que trabalham como técnicos laboratoriais, no Laboratório de Toxicologia do CESTEJ. Esse segundo grupo apesar de não ser exposto ao amianto, devido a sua atividade laboral, tem exposição a outros tipos de substâncias químicas, como solventes, metais e substâncias carcinogênicas.

IV.1. Dados Sócio Demográficos

O grupo populacional exposto ao amianto correspondeu a 52 trabalhadores, sendo 21 do sexo feminino e 31 do sexo masculino, representando 40,4% e 59,6%, respectivamente. A média de idade desta população foi em 57,9 anos, variando entre 28 e 78 anos e a média do tempo de exposição de 11,1 anos, com mínimo de 6 meses e máximo de 28 anos.

O relato de consumo alcoólico foi de 40,4%, sendo que 23,1% informaram uma frequência de até 2 vezes na semana, 11,5% uma vez por mês e 3,8% até 3 vezes na semana.

Com relação à escolaridade, foi relatado que 82,7% dos indivíduos sabiam ler e escrever e 3,8% não sabiam, sendo que 48,1% possuíam ensino fundamental incompleto, 21,2% ensino fundamental completo, 9,6% ensino médio completo e 5,8% ensino médio incompleto. A baixa escolaridade é um fator importante na percepção do risco de exposição e na ocorrência de acidentes de trabalho. Este fato pode ser observado em alguns estudos, que descrevem uma situação em que os trabalhadores com menor grau de escolaridade, mesmo realizando tarefas mais específicas, tinham uma percepção de risco menos acurada que aqueles com maior grau de escolaridade e que desempenhavam tarefas de menor conhecimento prático, contribuindo como um fator fundamental para o aumento da exposição e do número de casos de acidente. ^{(115),(116),(117)}

Os indivíduos deste grupo trabalharam em diversas empresas do Estado do Rio de Janeiro como a Casa Sano, Teadit, Servelit, porém as empresas de maior incidência foram

Asberit e Eternit, representando um percentual de 44,9% e 40,8%, respectivamente. Apenas 14% da população são economicamente ativas.

A jornada de trabalho relatada pelos trabalhadores foi de 40 horas semanais ou mais, sendo revezado em turnos diurnos e noturnos. As atividades profissionais exercidas pelos indivíduos foram diferentes de acordo com o sexo. Os homens, em sua maioria, trabalharam em atividades como moldador, empilhador de chapas, telhas e caixas d'água de amianto, operador de máquinas e com diversas atividades de manutenção, como maçariqueiro, pintor, eletricitista, soldador e encanador. As mulheres, apesar de também trabalharem em máquinas, suas funções eram mais delicadas, manuseando fios de amianto em fiandeiras, trançadeiras e retorcedeiras, que são máquinas alimentadas com amianto e calcita para formar fios de amianto, que são colocados em carretéis, para posterior uso. Além disso, também lavavam as roupas engomadas por amianto dos maridos ou familiares.

A fiação é o setor considerado pelos trabalhadores como um dos mais poluidores devido à excessiva poeira de amianto no ambiente. É o setor da produção que aloca o maior número de trabalhadores.

Ambos os sexos relataram um ambiente de trabalho com intensa poeira, ruído, calor e vapores de solventes irritantes de mucosas. Substâncias químicas, como solventes, tolueno, benzeno e resinas, muito utilizadas em diversas empresas, quando inaladas, podem provocar distúrbios respiratórios, hepáticos, neoplasias e danos ao sistema nervoso central.

Os EPIs (Equipamentos de Proteção Individual) são descritos como de uso freqüente, porém só passaram a ser usados a partir da década de 70. Alguns dos trabalhadores, que tinham contato direto com o fibrocimento, relataram alergia na pele.

Os trabalhadores selecionados que participaram deste estudo vêm sendo acompanhados por avaliações clínicas no ambulatório do CESTEJ. Nenhum dos indivíduos relatou ter feito uso de medicamentos anti-neoplásicos, embora vários citem uso de medicamentos para hipertensão e alergia respiratória.

O grupo Laboratório foi composto por 26 técnicos laboratoriais, sendo 18 do sexo feminino e 8 do sexo masculino (69,2% e 30,8% respectivamente) e média de idade de 28,6 anos. Com relação à escolaridade, 100% dos indivíduos sabiam ler e escrever, sendo que 96,2% possuíam mais que o ensino superior completo e 3,8% ensino fundamental completo. Diferentemente da população exposta ao amianto, esse grupo possui alta escolaridade, que é um fator importante no risco de exposição.

O relato de consumo alcoólico foi de 65,4%, sendo que 30,8% informaram uma frequência de até 2 vezes na semana, seguidos de 15,4% até 3 vezes na semana e 15,4% uma vez por mês.

Quanto à atividade de trabalho, 8 indivíduos são técnicos de nível superior, 10 estudantes de pós-graduação, 7 técnicos de nível médio, e 1 auxiliar de serviços gerais, com tempo da jornada de trabalho variando entre 20 e 40 horas. O tempo na função variou de 1,6 anos a 13 anos (média= 7,1 anos).

Os EPIs necessários ao desempenho das funções são descritos como de uso freqüente. Todos relatam nunca terem feito uso de medicamentos anti-neoplásicos e, em média, fizeram exames de raio-x há mais de um mês. Estes trabalhadores são expostos ocupacionalmente a solventes (hexano, metanol, etanol, acetonitrila), ácidos (acético, clorídrico, fosfórico, sulfúrico) e várias outras substâncias, em altas e baixas concentrações. A Tabela 2, a seguir, apresenta os dados sócio-demográficos das duas populações deste estudo.

Tabela 2 - Comparação dos dados sócio-demográficos das duas populações estudadas.

Variáveis	Populações de estudo			
	Expostos ao Amianto		Laboratório	
	Frequência	Porcentagem (%)	Frequência	Porcentagem (%)
Sexo				
Mulheres	21	40,4	18	69,2
Homens	31	59,6	8	30,8
Faltando	0	0,0	0	0,0
Analfabetismo				
Sabe ler e escrever	43	82,7	26	100,0
Não sabe ler e escrever	2	3,8	0	0,0
Faltando	7	13,5	0	0,0
Escolaridade				
Ensino fundamental completo	11	21,2	1	3,8
Ensino fundamental incompleto	25	48,1	0	0,0
Ensino médio completo	5	9,6	0	0,0
Ensino médio incompleto	3	5,8	0	0,0
Mais que o ensino médio	0	0,0	25	96,2
Faltando	8	15,4	0	0,0
População economicamente ativa				
Ativo	7	13,5	26	100
Aposentado	43	82,7	0	0,0
Faltando	2	3,8	0	0,0
Consumo de álcool				
Consumem	21	40,4	17	65,4
Não consomem	24	46,2	7	26,9
Faltando	7	13,5	2	7,7
Frequência de consumo de álcool				
Até 3 vezes na semana	2	3,8	4	15,4
Até 2 vezes na semana	12	23,1	8	30,8
Até 1 vez por mês	6	11,5	4	15,4
Faltando	32	61,5	10	38,5
Hábito de fumar				
Fumante	7	13,7	3	11,5
Não Fumante	24	46,2	19	73,1
Ex-fumante	20	38,4	2	7,7
Faltando	1	1,9	2	7,7

IV.2 - Análises Clínicas e Toxicológicas

A prova de função pulmonar mostrou que 79,8% dos trabalhadores expostos ao amianto apresentavam distúrbios, sendo o nível leve o mais recorrente (32,7%), seguido do moderado (15,4%) e acentuado (1,9%). Dos participantes que tiveram distúrbios respiratórios, 73,4% eram doentes e 43,3% e 20,0% ex-fumantes e fumantes, respectivamente, o que justificam o elevado percentual de danos respiratórios. Junto à prova de função, foi avaliada, também, a broncodilatação, revelando que 71,4% dos voluntários apresentavam alteração, sendo 5,8% deles, com critério para asma brônquica. Assim como para prova de função, 80% dos participantes que tiveram resultados alterados eram doentes e 63,3% fumantes ou ex-fumante.

Estes achados estão de acordo com informações bibliográficas, sobre as associações entre a exposição ocupacional e ambiental à poeira de asbesto e uma série de efeitos sobre a saúde, incluindo limitação crônica do fluxo aéreo.⁽¹¹⁸⁾ Entretanto, distúrbios ventilatórios são alterações inespecíficas e comumente atribuídas, também, ao tabagismo.⁽¹¹⁹⁾

No estudo realizado por Bagatin (2002),⁽¹¹⁹⁾ foram avaliadas mais de 4.000 espirometrias em trabalhadores e ex-trabalhadores expostos ao asbesto, em uma mineração de crisotila, e aproximadamente 20% delas estavam alteradas. Segundo o estudo⁽¹¹⁹⁾, mudanças progressivas na ocorrência e na gravidade das alterações funcionais ventilatórias e de trocas gasosas têm sido descritas, possivelmente, devido as diferenças na exposição cumulativa, no tipo de fibra utilizada e nos cuidados de proteção no ambiente de trabalho.

Não foi possível realizar a prova de função pulmonar no grupo Laboratório, devido à grande demanda do Ambulatório de Pneumopatia Ocupacional do CESTEJ.

Com relação às análises toxicológicas de ensaio cometa, catalase e GST aplicadas à população exposta ao amianto e à população laboratório, seus resultados estão apresentados na Tabela 3. Todos os indicadores avaliados apresentaram distribuição normal.

O teste do ensaio cometa deve ser realizado em ambiente com umidade adequada, para que a adesão da agarose, com ponto de fusão normal, ocorra corretamente e não interfira nas outras etapas da técnica. Além disso, outro fator importante é a temperatura ambiente, no momento da realização das etapas de tratamento alcalino (pH>13) e de eletroforese das lâminas. Speit, G. *et al.* (1999)⁽¹²⁰⁾ realizaram um estudo comparando a influência da temperatura ambiente (4 e 20°C) durante o tratamento alcalino e a eletroforese, observando que o aumento da temperatura aumenta significativamente a

migração de DNA. Inicialmente, devido a problemas no ar condicionado central do Laboratório de Toxicologia do CESTEJ, não foi possível controlar devidamente estas condições, sendo a causa principal da perda de amostras.

Os resultados dos indicadores biológicos apresentaram uma diferença extremamente significativa para a enzima do estresse oxidativo GST ($p=0,005$) e para o teste de Ensaio Cometa ($p=0,00$), expressado tanto em Unidade Arbitrária (UA), quanto em porcentagem (%), entre as duas populações. Diferenças estatisticamente significativas, também, foram encontradas para as médias de idade e de tempo de exposição, que foram maiores na população exposta ao amianto.

Tabela 3 - Comparação dos resultados de variáveis entre a população exposta ao amianto e a população laboratório.

Variáveis	Grupos de estudo							
	Exposto ao Amianto				Laboratório			
	N	Mínimo	Máximo	Média±SD	N	Mínimo	Máximo	Média±SD
Cometa (UA)	22	11	86	47,73±15,42***	12	5	21	12,17±5,20***
Cometa (%)	22	10	58	39,91±10,06***	12	5	21	12,08±5,14***
Catalase (K/g Hb)	39	21,85	75,05	37,44±11,32	15	23,75	51,25	38,58±8,81
GST (unid/mL enzima)	42	0,06	3,95	1,60±0,89**	13	1,50	4,10	2,35±0,72**
Idade (anos)	52	28	78	57,87±9,44***	24	22	50	28,63±6,63***
Exposição (anos)	52	0,5	28	11,14±6,85***	24	1,5	13	7,08±3,48***

*** $p < 0,000$

** $p < 0,01$

* $p < 0,05$

No estudo epidemiológico caso-controle realizado, por Dušinská, M. *et al.* (2004),⁽¹²¹⁾ em uma antiga fábrica de cimento amianto, na Eslováquia, foram pesquisados 82 indivíduos, sendo 61 trabalhadores expostos e 21 trabalhadores controle da mesma fábrica. A análise de ensaio cometa apresentou média de 78 ± 5 UA, para a população exposta ao amianto, e média de 74 ± 14 UA, para população controle, não sendo encontrada diferença significativa entre os dois grupos. A média da população exposta da antiga fábrica de cimento amianto foi muito superior à encontrada neste estudo. Essa diferença pode ter ocorrido, devido a uma possível diferença no grau de asbestose, o qual não foi apresentado no artigo e ao fato dos trabalhadores da fábrica estarem em exposição durante o estudo.

Além disso, a média da população controle do artigo também foi muito superior a da população laboratório. Esse fato pode ser devido à possível dispersão da poeira de asbesto pelo ar, atingindo setores da fábrica que não lidam diretamente com o amianto, promovendo a exposição dos trabalhadores compreendidos no grupo controle. Esses trabalhadores podem estar expostos ao asbesto sem sinais clínicos de asbestose.

Em outro estudo mais recente realizado, também, por Dušinská, M. *et al.* (2006),⁽¹²²⁾ 388 indivíduos foram avaliados quanto a exposição ocupacional a fibras de amianto, “lã de pedra” ou de vidro. Destes trabalhadores 239 foram expostos e 149 controles não expostos. Os participantes do estudo foram avaliados, quanto aos níveis de alterações nas bases de DNA (oxidação e alquilação) em linfócitos, utilizando o ensaio cometa com lesão-específica para endonuclease III, em conjunto com o *score* visual, quanto a atividade de reparação de DNA da enzima 8-oxoguanine DNA glicosilase (OGG1) e quanto ao polimorfismo 23A→G no gene XPA de reparação do DNA. Os autores encontraram frequência de quebras em DNA significativamente maiores nas populações expostas, em comparação ao grupo controle, não sendo encontrado efeito da exposição sobre os diversos tipos específicos de dano. Os níveis de dano no DNA, também, foram associados com a presença do alelo A, bem como com maior atividade da enzima reparação (OGG1), indicando um possível papel na reparação de bases oxidadas e, além disso, uma correlação altamente significativa foi encontrada, entre os danos de DNA e a idade, quando toda a população ou subgrupos da mesma foram analisados.

As diferenças significativas de idade e tempo de exposição, entre as populações exposta ao amianto e laboratório, são fatores importantes, que devem ser considerados, durante a comparação dos dados de ensaio cometa encontrados neste estudo. Além disso,

análise comparativa dos indicadores biológicos foi realizada entre homens e mulheres e nenhuma diferença significativa entre esses grupos foi encontrada.

Relatos são encontrados na literatura sobre a influência da idade no processo de reparo do DNA, onde populações mais velhas apresentam níveis de danos no DNA maiores que populações mais novas, devido a um possível declínio da eficiência de reparo destes danos. Sendo assim, populações mais velhas, possuem menor reparo de danos no DNA e, conseqüentemente, são mais sensíveis as exposições aos agentes genotóxicos.^{(123),(124)} Além disso, deve ser levado em consideração, que quanto maior a idade, maior é tempo de exposição aos agentes carcinógenos, a senescência imunológica (envelhecimento do sistema de defesa humano), as alterações na composição dos tecidos, as mutações genéticas e um maior período de latência, levando a um aumento na detecção dos cânceres. Entretanto, a influência da idade e outras variáveis, como sexo e hábito de fumar, nos resultados do Ensaio Cometa ainda é bastante controversa, permanecendo em discussão.^{(125),(126),(127)}

Møller, P. (2006)⁽¹²⁵⁾ realizou um levantamento bibliográfico sobre os níveis de danos no DNA, avaliados por Ensaio Cometa, em 125 estudos, e encontrou cinco artigos que avaliam os indivíduos por grupos de faixas etárias. Através de análise estatística do efeito da idade, os danos do DNA por grupo estratificado foram utilizados, encontrando uma associação positiva da idade sobre os níveis de lesões do DNA ($r = 0,31$, $p < 0,001$). No entanto, o autor afirma que são necessários estudos mais robustos, para poder afirmar está associação.

Em estudos sobre genotoxicidade de substâncias químicas em populações humanas, há grandes dificuldades em se estabelecer uma população de fato como controle, devido aos vários fatores químicos, físicos e biológicos presentes nos diversos ambientes, sendo muitas vezes necessário e de grande utilidade, a realização de comparações entre populações diferentes.

Apesar das diferenças de idade, escolaridade, e número, entre o grupo exposto ao amianto e o grupo laboratório, os resultados de ensaio cometa e da GST obtidos neste estudo foram significativos, demonstrando uma relação entre a exposição e a alteração de parâmetros enzimáticos do estresse oxidativo e danos no DNA.

Segundo Møller, P. (2006),⁽¹²⁵⁾ os níveis de danos no DNA obtidos através de visual *score*, em populações humanas, apresentaram uma média de 10,6 UA, variando entre 3,9 UA–17,7 UA. Em um estudo brasileiro, realizado por Maluf, S.W (2001),⁽¹²⁸⁾ foi

encontrada média de danos no DNA de 17,33UA no grupo controle. No atual estudo, a média de ensaio cometa encontrado na população laboratório foi de 12,17 UA, estando dentro dos valores encontrados em literatura nas diversas populações, demonstrando que apesar das diferenças encontradas entre variáveis como idade, tempo de exposição, escolaridade e número, foi encontrada diferença estatisticamente significativa de níveis de danos no DNA entre as duas populações, podendo-se afirmar que este resultado foi causado pela exposição ao amianto.

Outros estudos evidenciam cada vez mais que tanto os fatores genéticos, quanto os ambientais podem influenciar no desenvolvimento da asbestose. ^{(129),(130)} Muitos argumentos suportam a hipótese de que os marcadores da resposta ao estresse oxidativo sejam um intermediário fenotípico para as pneumoconioses. É de conhecimento científico que a pneumoconiose está relacionada com o aumento quantitativo de espécies reativas de oxigênio (ERO) e, as enzimas catalase, glutathione peroxidase e a superóxido desmutase atuam na degradação destas moléculas. ⁽¹³¹⁾

Neste estudo, não houve diferença significativa entre as médias de atividade da catalase dos grupos exposto ao amianto e laboratório. No entanto, a literatura aponta para um aumento da atividade da catalase induzida pelas fibras de amianto. ⁽¹³²⁾

Evidências da relação da catalase com danos no DNA, provocados por H₂O₂, foram relatadas por Cemeli, E., Baumgarten, A. e Anderson, D., (2008) ⁽¹³³⁾ em experimentos *in vitro*. Linfócitos humanos foram incubados com diferentes concentrações (100 UI/mL – 500 UI/mL) de enzima catalase e os danos no DNA foram avaliados. Os resultados demonstraram que em concentração de 500 UI/mL não houve danos gerados no DNA. É importante ressaltar que em todas as concentrações testadas houve uma diminuição desses efeitos.

Os metabólitos reativos mais importantes na patogênese de doenças pulmonares relacionadas ao amianto são os radicais superóxido, peróxido de hidrogênio, hidroxil e o óxido nítrico. O ânion superóxido, formado em reações de transporte de elétrons do oxigênio, é um composto com tempo de vida relativamente longo em sistemas biológicos, e sofre dismutação tanto não enzimaticamente, quanto pela ação da enzima superóxido desmutase, formando o peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio é menos reativo que o superóxido, porém exerce efeitos tóxicos através de reações com outras moléculas produzindo radicais hidroxil. Esses radicais podem ser formados pelo H₂O₂ e pelo

superóxido, nas reações de Fenton e de Haber-Weiss. A reatividade do radical hidroxil é muito elevada e de curta duração, reagindo com moléculas alvo imediatamente. ⁽¹³⁴⁾

A catalase é uma enzima antioxidante endógena que catalisa a redução de H₂O₂ em água (H₂O) e oxigênio (O₂), e desempenha um importante papel no controle das concentrações de H₂O₂ em células humanas. Juntamente com outras enzimas antioxidantes, elas atuam na defesa primária contra EROs e estudos sugerem que a atividade da catalase possa desempenhar um papel importante na resposta ao estresse oxidativo, podendo estar associada ao aumento do risco de certas doenças. ⁽¹³⁵⁾

Em situações de avaliação *in vivo*, como no presente estudo, inúmeros fatores podem influenciar nessas reações como variações metabólicas, saturação enzimática, expressão gênica, diferenças fenotípicas, entre outros.

Franko, A.; *et al.* (2008) ⁽¹³⁶⁾ investigaram a associação do polimorfismo genético CAT -262 C>T em 262 trabalhadores expostos ao amianto com asbestose e 265 trabalhadores expostos não doentes, encontrando uma menor atividade da catalase em indivíduos com genótipo TT CAT-262. Segundo o autor, esses resultados podem estar relacionados com um maior risco de desenvolvimento de asbestose nesses trabalhadores. Além disso, o estudo evidencia uma possível influência do genótipo na atividade da catalase.

Por sua vez, a enzima GST apresentou média de sua atividade significativamente menor ($p=0,008$) para a população exposta ao amianto (média=1,60±0,89), em comparação com a população do laboratório (média=2,35±0,72). Ao contrário das outras enzimas do estresse oxidativo, a GST apresenta uma depleção de sua atividade induzida pelo asbesto.

Um estudo, realizado com mineradores altamente expostos a poeira de carvão, avaliou as mudanças na atividade da GST e um decréscimo foi encontrado em trabalhadores com fases iniciais de pneumoconiose (0/1-1/2), quando comparados com o controle. E em trabalhadores com progressão da doença (>2/1), a atividade da GST não apresentou diferença com o controle. ⁽¹³⁶⁾

Segundo Evelo C.T.A., Bos R.P, Borm P.J.A. (1993), ⁽¹³⁷⁾ a diminuição da concentração de GSH e da atividade da GST é causada pela excessiva liberação de espécies reativas de oxigênio por macrófagos alveolares e neutrófilos, no tecido pulmonar. Essas espécies reativas podem danificar a enzima GST, através da oxidação de seus sítios SH, e conseqüentemente, causar o acúmulo de metabólitos nos pulmões. A posterior restauração da concentração GSH aos níveis normais, em mineradores com

pneumoconiose acima de 2/1, foi explicada pelo autor, por um possível efluxo hepático de GSH, e o aumento do teor de proteína GST, como consequência de um aumento da síntese protéica durante proliferação eritrocitária, ou menos provavelmente, de um aumento da longevidade da enzima. Essa proliferação pode ser desencadeada por processos inflamatórios geradores de citoquina.

Assim, o decréscimo na atividade da GST em fases iniciais de pneumoconiose, assim como a diminuições na atividade da glutathione peroxidase (GPx) e nas concentrações de glutathione (GSH), relatadas cientificamente, podem ser origem de danos causados por espécies reativas de oxigênio. Essas alterações podem implicar em uma diminuição da capacidade de desintoxicação de compostos electrofilicos e oxidativos, durante este estágio da doença, favorecendo um aumento nos danos causados no DNA.

Além disso, o polimorfismo da GST, também, vem sendo associado a uma maior sensibilidade a diversos compostos químicos, inclusive o amianto.^{(137),(138),(139)} Um estudo recente, realizado por Franko, A. (2008),⁽¹⁴⁰⁾ conclui que o genótipo GSTP1 codifica uma enzima com alta capacidade de conjugação, aumentando significativamente o risco de desenvolver asbestose.

Para melhor visualização das diferenças dos indicadores biológicos ensaio cometa, catalase e GST, entre as duas populações estudadas neste trabalho, os gráficos boxplot dos respectivos indicadores estão ilustrados na Figura 8 a seguir.

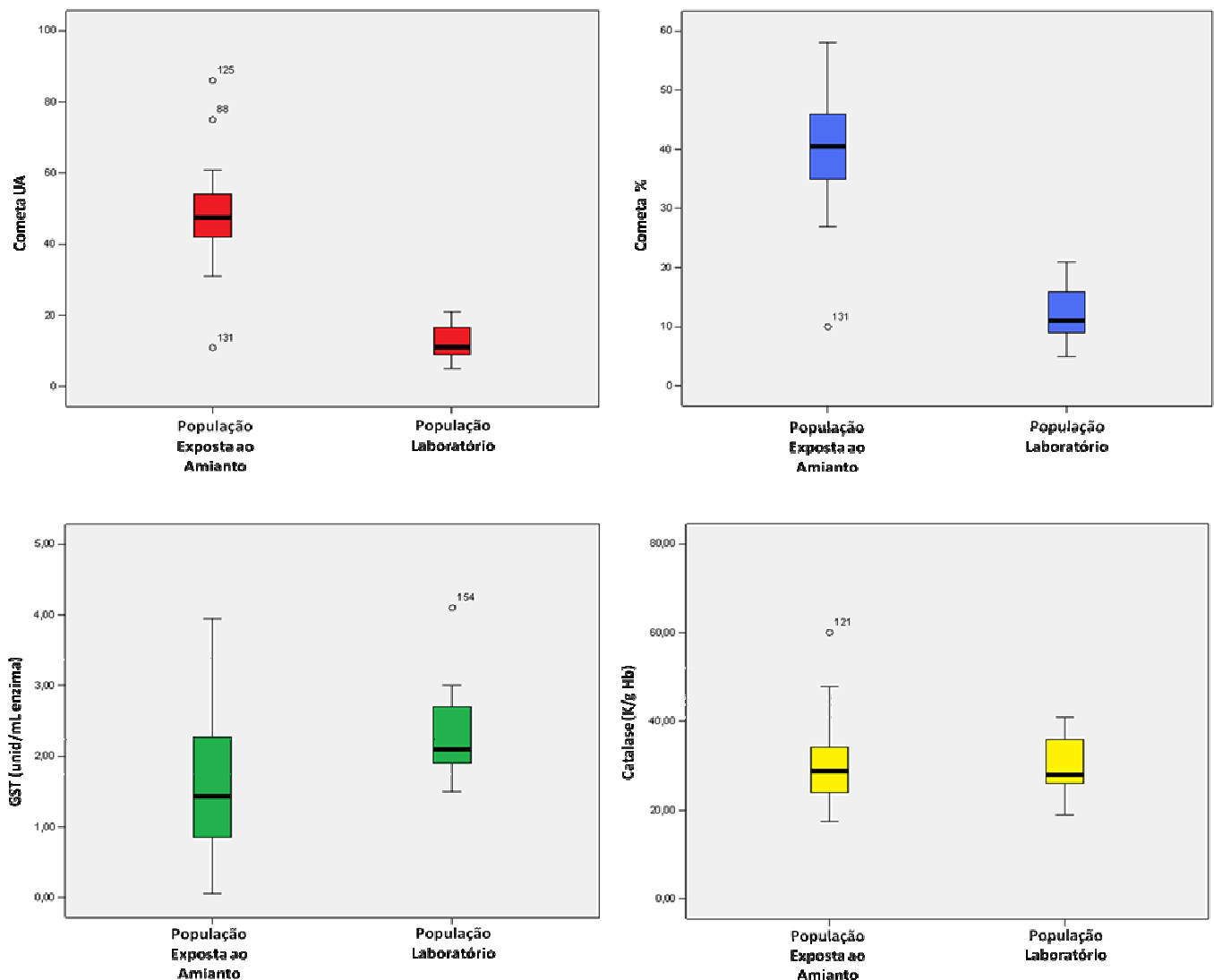


Figura 8 - Gráficos Boxplot comparativo dos indicadores biológicos entre as duas populações. Relação dos Indicadores com à asbestose

Os trabalhadores expostos foram classificados conforme preconiza a OIT (Organização Internacional do Trabalho) quanto ao grau da doença. Dessa forma, esses trabalhadores foram classificados quanto ao estado de doença, sendo divididos em dois grupos: expostos não doentes e expostos doentes, com uma proporção de 66% e 34% respectivamente, sendo que, dentre os expostos doentes, apenas um indivíduo apresentou raio-x de categoria 2, enquanto que o restante foi classificado como categoria 1. Trabalhadores com diagnóstico de asbestose mais avançada não puderam ser incluídos no estudo em virtude da necessidade de equipamentos ambulatoriais que dessem suporte a crises respiratórias graves, características nesse estágio da doença.

Os resultados das análises dos indicadores toxicológicos foram comparados entre os grupos exposto doente e exposto não doente, estando apresentados na Tabela 4 a seguir.

Tabela 4 - Comparação dos resultados de variáveis entre os grupos doente e não doente da população exposta ao amianto.

Variáveis	Grupos Exposto ao Amianto			
	Exposto não doente		Exposto doente	
	n	Média±SD	n	Média±SD
Cometa (UA)	11	47,82±8,4	10	48,20±21,73
Cometa (%)	11	40,91±6,01	10	39,20±13,88
Catalase (K/g Hb)	24	29,11±8,70	13	31,78±10,44
GST (unid/mL enzima)	27	1,45±0,77	14	1,95±1,06
Idade (anos)	33	56,27±8,97*	17	62,12±9,06*
Exposição (anos)	33	9,39±6,21*	17	14,06±7,41*

* p< 0,05

Houve diferença significativa entre os grupos com relação à idade e ao tempo de exposição. Os trabalhadores expostos doentes apresentaram médias de idade e de tempo de exposição maiores que as médias dos trabalhadores não doentes. Isso ocorreu, provavelmente, por que em geral, se leva de 15 a 25 anos para a asbestose se manifestar. Porém, esta doença pode ocorrer antes, caso haja exposição a grandes quantidades de poeira. O aparecimento da doença depende da concentração de amianto e do tempo de exposição, o que significa que quanto maior a concentração de poeira no ambiente de trabalho e maior for o tempo de exposição, mais graves podem ser os sintomas da doença e limitações para a vida do paciente. A asbestose leva ao óbito lentamente, e por isso é conhecida como “morte lenta”, com quadros recorrentes de pneumonia, falta de ar cada vez mais graves e incapacitantes, mesmo para pequenos esforços. ⁽¹⁶⁾

Segundo Craighead (1988),⁽¹⁴¹⁾ são fatores considerados importantes para o aparecimento das pneumoconioses, a quantidade de poeira inalada; o tamanho e a natureza química da partícula; a duração da exposição; a suscetibilidade individual e o exercício durante a exposição, pois aumenta diretamente a carga da exposição em função do aumento do volume-minuto inspirado.

Não foi encontrada diferença entre os expostos doentes e não doentes para todas as análises dos indicadores toxicológicos. Porém, os resultados de ensaio cometa tanto para os expostos doentes ($p=0,000$), quanto para os não doentes ($p=0,000$), apresentaram diferença significativa em comparação com o grupo laboratório.

O teste cometa se mostrou sensível na diferenciação de populações expostas e não expostas ao amianto, sendo possível considerá-lo um importante indicador de exposição neste estudo. Assim, o ensaio cometa mostrou ser um método confiável e sensível para a detecção de danos no DNA em células individuais, sendo um importante indicador no biomonitoramento de populações expostas a agentes genotóxicos, podendo representar uma ferramenta útil em avaliações de mutagenicidade.

Com relação às atividades das enzimas GST e Catalase embora não tenha tido diferença significativa entre os grupos, as atividades destas enzimas foram maiores no grupo de exposto doente. Além disso, a GST apresentou uma diferença não significativa de $p=0,092$ entre os grupos expostos e o grupo exposto não doente uma diferença significativa ($p=0,008$) com o grupo laboratório. Como já relatado anteriormente a GST diminui no início do processo inflamatório, isto é, indivíduos expostos normais e no início da doença (0/1) e após a instalação da doença os níveis desta enzima tendem a voltar ao normal. Neste estudo os níveis dessa enzima apresentam valores menores no grupo exposto não doente ($1,45\pm 0,77$) e valores mais próximos ao do grupo laboratório ($2,35\pm 0,72$), para o grupo exposto doente ($1,95\pm 1,06$). Esses resultados reforçam dados encontrados na literatura. Esta diferença talvez possa se tornar significativa com o aumento do N da população e com inclusão de pacientes com estágios mais avançado de asbestose.

Relação dos indicadores com o hábito de fumar

Outra comparação foi realizada com indivíduos fumantes, ex-fumantes e não fumantes. Com relação à prova de espirometria, 79,8% e 80% dos indivíduos expostos ao amianto apresentaram distúrbios para função pulmonar e broncodilatação, respectivamente, sendo que 43,33% eram ex-fumantes e 20% fumantes.

Devido ao baixo número de indivíduos fumantes e ao fato dos efeitos tóxicos do cigarro permanecerem por longo tempo, após o inter rompimento do hábito de fumar, os trabalhadores fumantes e ex-fumantes foram reunidos em um único grupo (Fumaram) para fins comparativos das variáveis, que estão expressos nas Tabelas 5 e 6 para as populações laboratório e exposta ao amianto, respectivamente.

Tabela 5 - Comparação dos resultados de variáveis entre população fumante e ex-fumantes e não fumante do grupo laboratório.

Variáveis	Grupos Laboratório			
	Fumaram		Nunca Fumaram	
	n	Média±SD	n	Média±SD
Cometa (UA)	3	19,33±2,08**	8	9,63±3,42**
Cometa (%)	3	19,33±2,08**	8	9,50±3,16**
Catalase (K/g Hb)	4	29,75±4,19	11	31,27±7,98
GST (unid/mL enzima)	3	2,17±0,67	10	2,40±0,76
Idade (anos)	5	24,80±2,17	19	29,63±7,07
Exposição (anos)	5	6,10±3,42	19	7,34±3,54

*** p< 0,000

** p< 0,01

* p< 0,05

Houve uma diferença estatisticamente significativa entre os indivíduos que nunca fumaram e os que fumaram, para o Ensaio Cometa, tanto em UA (p=0,001) quanto em % (p=0,001). Alguns achados científicos relatam um aumento de quebras da fita de DNA em indivíduos fumantes. ^{(142), (143),(144)}

Zalata, A.(2007) ⁽¹⁴⁴⁾ estudou os efeitos do tabaco em crianças fumantes passivas, avaliando a associação entre a exposição ambiental a fumaça do cigarro e os danos no DNA em relação ao estresse oxidativo, através de ensaio cometa e da atividade da enzima Glutathione Peroxidase (GSH-PX) em eritrócitos. Outras análises realizadas foram os níveis séricos de malondialdeído (MDA) e tocoferol (α,β,γ). Um aumento significativo de danos no DNA foi encontrado em crianças expostas ambientalmente em comparação com o controle. Paralelamente, crianças expostas tiveram, significativamente, níveis de MDA maiores e decréscimo da atividade da enzima GSH-PX e dos níveis de tocoferol sérico. O estudo demonstrou que a exposição ambiental ao tabaco está associada a um aumento dos níveis de oxidantes e a um decréscimo dos níveis de antioxidantes sanguíneos. Além disso, esse desequilíbrio entre oxidante-antioxidante pode ser o mecanismo dos danos no DNA detectados em linfócitos.

Em outro estudo realizado, por Y. Lu and K. Morimoto (2008),⁽¹⁴³⁾ 53 homens fumantes japoneses foram avaliados quanto aos efeitos causados no DNA pelo cigarro,

através de ensaio cometa. Quebras de DNA foram significativamente associadas aos anos de fumo, quantidade de maços de cigarro/ano, aos níveis de nicotina e alcatrão (mg/dia). E os níveis de alcatrão mostraram ser preditores significativos do momento de cauda do cometa. Estes resultados sugerem que os níveis de exposição ao cigarro por alcatrão e a nicotina (mg / dia) seriam um parâmetro sensível na apreciação da genotoxicidade do cigarro nestes indivíduos.

No entanto, segundo o levantamento realizado por Møller, P.(2006),⁽¹²⁵⁾ o tabagismo não se apresentou um forte determinante de genotoxicidade detectado pelo teste de Ensaio Cometa, sendo necessário estudo mais consistentes para afirmar tal efeito.

Diferentemente do grupo laboratório, a população exposta ao amianto não apresentou diferença significativa entre os indivíduos que nunca fumaram e os que fumaram para o teste de ensaio cometa (Tabela 6).

Tabela 6 - Comparação dos resultados de variáveis entre população fumante e ex-fumantes e não fumante exposta ao amianto.

Variáveis	Grupos Exposto ao Amianto			
	Fumaram		Nunca Fumaram	
	n	Média±SD	n	Média±SD
Cometa (UA)	14	46,07±15,45	8	50,63±15,95
Cometa (%)	14	38,43±11,04	8	42,50±8,07
Catalase (K/g Hb)	19	32,51±10,45	19	27,10±6,83
GST (unid/mL enzima)	22	1,64±0,91	19	1,53±0,92
Idade (anos)	27	59,70±8,87	24	56,38±9,69
Exposição (anos)	27	10,48±7,64	24	12,22±5,78

O teste de ensaio cometa, no presente estudo, apresentou diferença significativa entre indivíduos que fumaram e nunca fumaram para o grupo laboratório e não para o grupo exposto ao amianto. Esses resultados podem indicar que a exposição ao amianto possa estar sobrepujando os efeitos do cigarro nesta população. Uma segunda hipótese é a de que em casos onde a exposição ocupacional à substâncias químicas não seja tão predominante (grupo laboratório), o ensaio cometa é suficientemente sensível para detectar diferenças entre hábitos como neste caso o tabagismo.

Contraditoriamente, indivíduos do grupo exposto ao amianto que fumaram tiveram média menor de danos no DNA que indivíduos que nunca fumaram. Dušinská, M., *et al* (2004),⁽¹²¹⁾ além de avaliarem os efeitos da exposição ao asbesto em trabalhadores expostos ao asbesto, em uma fábrica de fibrocimento na Eslováquia, compararam, também, os efeitos do hábito de fumar entre estes trabalhadores. Foram avaliados 82 trabalhadores no total, sendo 61 expostos ao amianto (24 fumantes e 37 não fumantes) e 21 controles da fábrica (8 fumantes e 13 não fumantes). Nos resultados encontrados, expostos não fumantes apresentaram níveis de quebra de DNA maiores que expostos fumantes e que controle não fumantes. Segundo o autor, uma possível explicação é que o tabagismo torna menos sensíveis os danos causados pelo amianto. Essa mesma observação foi feita em ratos expostos a fibras de amianto e ao tabaco por inalação simultânea, levando estes últimos a menores níveis de lesões do DNA. Outra observação feita foi a interação sinérgica entre o tabagismo e a exposição ao asbesto, que aumenta significativamente o aparecimento de aberrações cromossomiais, troca de cromátides irmãs e micronúcleo em indivíduos expostos fumantes.

Embora os dados obtidos nesta dissertação não revelarem uma associação entre o hábito de fumar e o aumento dos níveis de danos no DNA, em indivíduos expostos ao asbesto, estudos já demonstraram, que o hábito de fumar aumenta o risco de desenvolvimento e agravamento da asbestose, além de potencializar o risco de carcinoma pulmonar, com uma magnitude de 1.6 vezes.⁽¹⁴⁷⁾

Com relação às enzimas GST e CAT, não foram encontradas diferenças significativas entre os indivíduos que já fumaram e nunca fumaram do grupo laboratório e do grupo exposto ao asbesto. Entretanto, dados científicos revelam um aumento das atividades de enzimas do estresse oxidativo, provocado pela exposição ao tabaco.

Mak, J.C.W. *et al.* (2007)⁽¹⁴⁵⁾ avaliaram o risco de Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) em indivíduos fumantes com a doença, comparando com controles fumantes saudáveis, através da investigação da atividade das enzimas Catalase e da Manganês Superóxido-Desmutase (Mn-SOD) e do polimorfismo -262 C>T e Ala16Val das respectivas enzimas. Não foram encontradas diferenças significativas na distribuição dos diferentes genótipos ou frequência de alelos entre pacientes e controles para ambas as enzimas. Entre controles saudáveis ou pacientes com DPOC, não foram observadas diferenças de atividade da SOD. A Catalase eritrocitária apresentou atividade significativamente maior em pacientes com DPOC que em controles saudáveis. O aumento

na atividade catalase eritrocitária em pacientes chineses com DPOC provavelmente indica disfunção no sistema de defesa oxidante/antioxidante, porém não está claro se esse aumento é compensatório ou um fator patogênico.

O mesmo tipo de estudo foi realizado, utilizando-se a atividade da enzima GST e seus polimorfismos, com o objetivo de se determinar o papel dos genótipos que regulam glutathione S-transferase (GST) e sua atividade plasmática na patogênese da doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC). Para tanto, foram avaliados 163 pacientes com DPOC e 163 controles saudáveis, ambos fumantes. Não houve diferenças significativas na distribuição dos diferentes genótipos do polimorfismo do GSTT1, GSTP1 e GSTM1 entre pacientes com DPOC e controles saudáveis. A atividade da GST foi significativamente maior em pacientes comparados com os controles, independentemente de suas diferenças genótipos, não sendo encontrada diferença de atividade entre os níveis de obstrução ao fluxo aéreo. ⁽¹⁴⁶⁾

Para o grupo Laboratório, uma possível justificativa dos resultados das enzimas do estresse oxidativo não terem diferença estatística significativa, entre indivíduos que já fumaram e nunca fumaram, é o pequeno N da população classificada como já fumaram. Enquanto que, para o grupo Exposto ao Amianto, a própria exposição pode estar interferindo nas enzimas do estresse oxidativo, de tal modo que os efeitos do tabagismo não sejam predominantes.

Devido a essas associações entre o cigarro e o aparecimento e agravamento de asbestose e de câncer de pulmão, foi calculado a odds ratio de indivíduos fumantes ou ex-fumantes desenvolverem pneumoconiose. A Tabela 7 a seguir, apresenta a proporção de indivíduos doentes e não doentes que fumam ou já fumaram e que nunca fumaram.

Tabela 7 - Cálculo de odds ratio relacionando hábito de fumar e exposição ao amianto.

	População Exposta ao Amianto		Total
	Exposto Doente	Exposto Não Doente	
Fumante e ex-fumantes	13	14	27
Não Fumante	5	17	22
Total	18	31	

Odds Ratio = 3,2
(Intervalo de confiança = 0,89 – 5,02)

Essa avaliação foi retrospectiva, pois a partir da doença-dano se busca fatores de exposição passados. O valor de odds ratio foi de 3,2, o que significa que a probabilidade de indivíduos que fumam ou já fumaram adoecerem é maior que a probabilidade de indivíduos que nunca fumaram. Entretanto, apesar dessa proporção, o valor de odds ratio encontrado não foi significativo para afirmar a associação entre o hábito de fumar e o aumento do desenvolvimento de asbestose, devido ao intervalo de confiança. Esse resultado encontrado provavelmente ocorreu devido ao pequeno N amostral.

O tabagismo aumenta a prevalência e a gravidade do quadro de fibrose pulmonar intersticial em trabalhadores expostos ao amianto. Segundo Osinubi, O.Y.O., *et al* (2002),⁽¹⁴⁷⁾ a mortalidade de asbestose se apresenta aproximadamente três vezes maior em trabalhadores que fumam um ou mais maços de cigarro/dia, comparado com não-fumantes.

Além disso, uma combinação entre o hábito de fumar e a exposição ao asbesto aumenta significativamente a proliferação celular no parênquima pulmonar. Este efeito é postulado ser importante tanto na fibrogenese, quanto na carcinogênese. Um estudo realizado por Churg e Stevens (1995)⁽¹⁴⁸⁾ indica que o tabagismo propicia a acumulação de fibras de amosita e crisotila na mucosa das vias aéreas. Esse processo pode desempenhar um papel na potencialização dos efeitos patológicos do amianto.

Outras análises estatísticas

O teste cometa, expressos tanto em UA quanto em %, não apresentou correlação com as enzimas do estresse oxidativo, porém, apresentou correlação de Pearson [($r=0,633$, $p=0,000$, $n=33$) / ($r=0,658$, $p=0,000$, $n=33$)], respectivamente, com a idade, para as duas populações juntas. Embora os dados sejam controversos com relação a idade, essa pode ser uma das influências nesta correlação. O grupo exposto possui uma média de idade maior e níveis de danos de DNA também maiores (UA e %). Dessa forma, esses aspectos podem estar influenciando fortemente nesta correlação.

Além disso, foi observado que as enzimas do estresse oxidativo Catalase e GST apresentaram uma correlação de Pearson estatisticamente significativa ($r= 0,405$, $p= 0,021$, $n= 32$). Esse fato demonstra sensibilidade dos indicadores de efeito Catalase e GST para avaliar a exposição, embora para a catalase não tenha sido encontrada diferenças significativas entre os grupos. A partir dessa correlação, foi desenvolvido um modelo de regressão linear com o grupo exposto onde foram encontrados $r^2=0,200$ e $\beta= 4,47$ com

p=0,009. Esses dados demonstram que a enzima GST é preditiva 20% para alterações da enzima catalase.

A correlação pode ser melhor visualizada graficamente na Figura 9, que apresenta a regressão linear entre as atividades das enzimas catalase e GST e a distribuição dos seus valores.

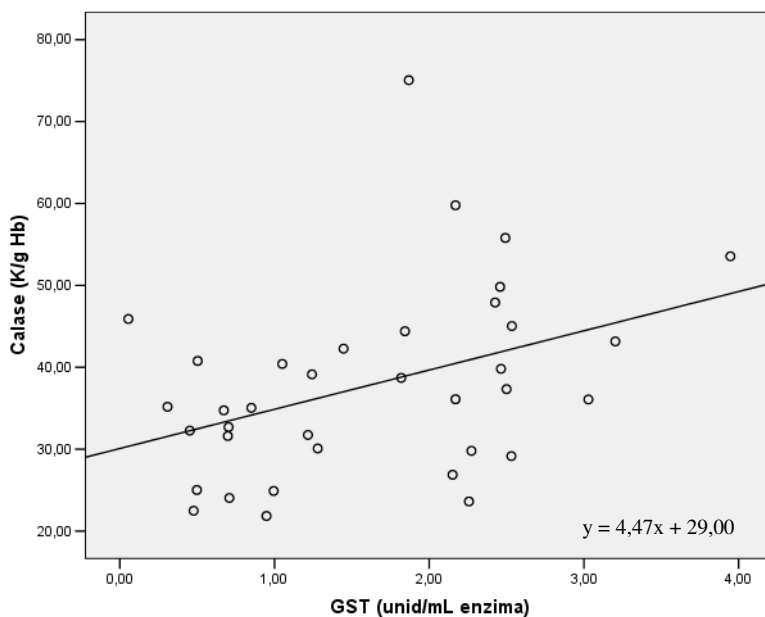


Figura 9 - Distribuição dos níveis dos indicadores de efeito do estresse oxidativo Catalase e GST dos trabalhadores exposto ao amianto.

O desempenho do teste cometa, também, foi avaliado através de uma curva ROC (*receiver operating characteristic*), ferramenta muito utilizada para medir e especificar problemas no desempenho de diagnósticos, que permite estudar a variação da sensibilidade e especificidade de um método, para diferentes valores de corte. Os valores determinados por diferentes pontos de corte do Ensaio Cometa (UA e %), segundo a curva ROC, estão demonstrados na Tabela 8 a seguir.

Tabela 8 - Valores de Ensaio Cometa, expressos em UA e em %, com maior sensibilidade e especificidade, para diagnóstico de exposição ao amianto determinada por diferentes pontos de corte de cometa segundo as curvas ROC.

Variáveis	Pontos de cortes	Área sob a curva	Intervalo de confiança (95%)	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)
Cometa UA	20,50	0,979*	0,935-1,023	95,5	92,7
	26,00	0,979*	0,935-1,023	95,5	100
	31,50	0,979*	0,935-1,023	90,9	100
	33,50	0,979*	0,935-1,023	86,4	100
	38,50	0,979*	0,935-1,023	77,3	100
	43,00	0,979*	0,935-1,023	63,6	100
Cometa %	20,5	0,970*	0,909-1,030	95,5	92,7
	24,00	0,970*	0,909-1,030	95,5	100
	29,50	0,970*	0,909-1,030	90,9	100
	32,50	0,970*	0,909-1,030	86,4	100
	33,50	0,970*	0,909-1,030	81,8	100
	34,50	0,970*	0,909-1,030	77,3	100

Os resultados com melhor especificidade e sensibilidade obtidos foram 26 e 24 para cometas em UA e %, respectivamente, sendo adotado o ponto de corte de 25 UA. Esse ponto de corte foi utilizado como padrão sendo o valor máximo encontrado para o grupo não exposto, para testar os indicadores enzimáticos de estresse oxidativo CAT e GST, sendo obtido para a Catalase o ponto de corte de 28,02 (sensibilidade = 60% e especificidade = 100%). Os resultados para a GST não foram significativos.

Outro ponto de corte utilizado foi o valor de Ensaio Cometa de 40 UA, que, também, foi utilizado para testar os valores das atividades das enzimas Catalase e GST. O valor de ponto de corte para a Catalase continuou sendo de 28,02 (sensibilidade = 63,4% e especificidade = 100%) e os resultados para a GST não significativos.

Ambos os valores de Ensaio Cometa apresentaram sensibilidade e especificidade parecidas, para os pontos de corte da Catalase.

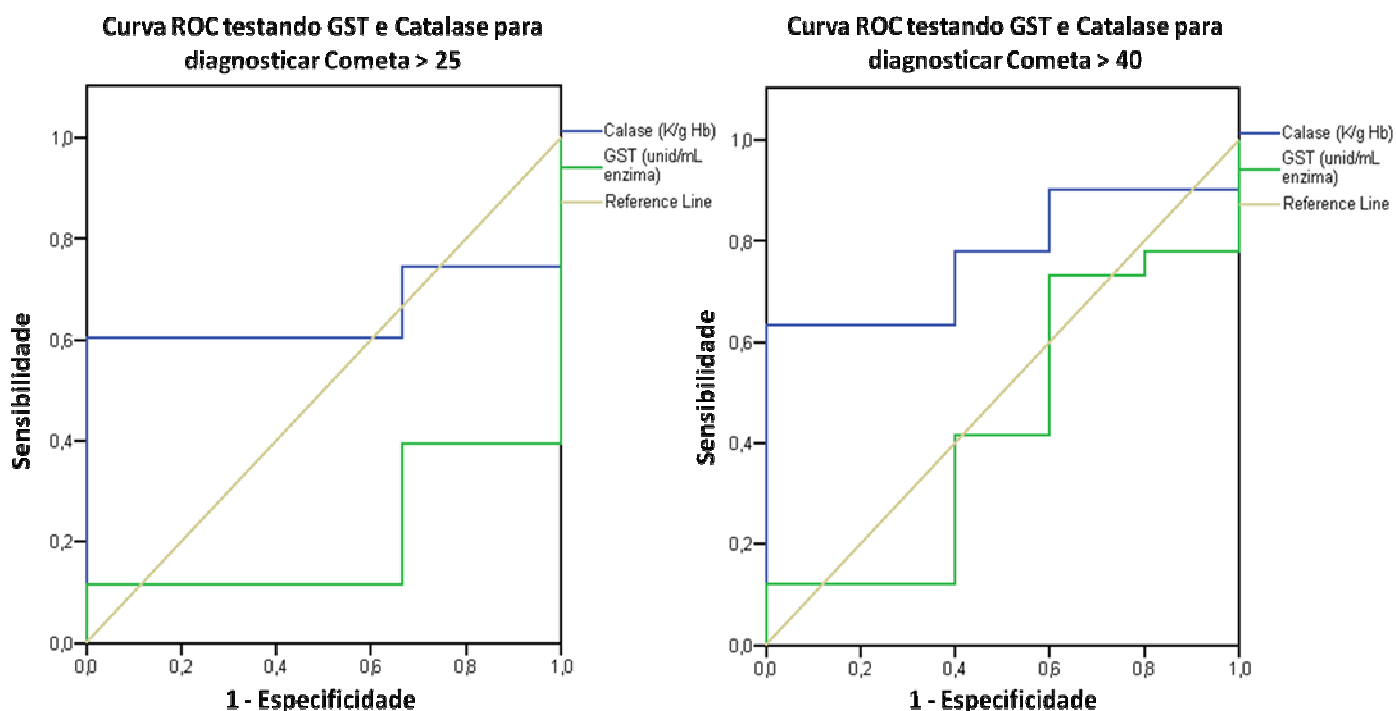


Figura 10 - Curvas ROC para testar GST e Catalase para diagnosticar cometa > 25 e >40.

Considerações finais

No atual estudo, os resultados de ensaio cometa e da atividade da GST foram significativos e demonstraram uma relação entre a exposição ao amianto e alterações de parâmetros enzimáticos do estresse oxidativo e danos no DNA.

Os indicadores biológicos têm sido vistos como uma forma de compreender o evento biológico no contexto da exposição ambiental e/ou ocupacional, cujo papel é antecipar o desfecho final do processo de adoecimento. Eles funcionam como poderosa ferramenta na investigação das doenças e, em alguns casos, ajudam a compreender o mecanismo de ação do agente nocivo, o papel dos metabolitos, as reações bioquímicas e outros aspectos relacionados à associação da exposição-doença.⁽¹⁴⁹⁾ A compreensão deste papel, talvez, permita a identificação dos efeitos causados pela exposição antes do aparecimento da doença, trabalhando para o seu diagnóstico precoce.

Nos casos dos indicadores, que avaliam a capacidade de uma determinada substância química alterar a estrutura do DNA celular e, conseqüentemente, estão associados ao aparecimento de câncer, um diagnóstico precoce aumentaria a sobrevivência dos pacientes. Um exemplo disso é a baixa sobrevivência de paciente com diagnóstico do câncer relacionado ao asbesto ou o mesotelioma de pleura, cuja detecção ocorre nas fases avançadas da doença e, portanto com pouca possibilidade de tratamento curativo.

A técnica de Ensaio Cometa vem desempenhando um papel cada vez mais importante no biomonitoramento em seres humanos e provou ser um valioso método geral para detecção de genotoxicidade em indivíduos expostos. O Ensaio Cometa tem sido usado como uma ferramenta na identificação de marcadores biológicos de dose efetiva, efeito e susceptibilidade individual. Além de fornecer dados sobre os efeitos da exposição genotóxica em populações humanas, o teste cometa tem rendido um grande volume de informações fundamentais sobre os mecanismos de genotoxicidade celular, sendo crucial para a interpretação dos dados de biovigilância em termos de risco de câncer. ⁽¹⁵⁰⁾

V – CONCLUSÕES

- O ensaio cometa demonstrou ser um método sensível e confiável na detecção de danos no DNA, causados pela exposição ao amianto, diferenciando estatisticamente a população exposta da não exposta, sendo possível considerá-lo um importante indicador de exposição e uma ferramenta útil em avaliações de mutagenicidade de populações expostas a agentes genotóxicos;
- Os resultados de ensaio cometa e da atividade da GST demonstraram uma relação entre a exposição ao amianto e alterações de parâmetros enzimáticos do estresse oxidativo e danos no DNA. No entanto, estudos para um melhor entendimento desta relação devem ser realizados com o objetivo de contribuir no esclarecimento do mecanismo de desenvolvimento da asbestose e do câncer, identificando efeitos que antecedam o aparecimento das doenças, podendo aumentar a sobrevivência dos indivíduos expostos;
- O hábito de fumar evidenciou uma associação positiva, porém não significativa, entre o hábito de fumar e o desenvolvimento de asbestose nos trabalhadores deste estudo;
- A enzima GST apresentou valor preditivo de 20% para alterações da enzima Catalase, demonstrando a sensibilidade destes indicadores de efeito na avaliação da exposição.

VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Ministério da Saúde. Protocolo de Vigilância em Saúde do Trabalhador (VISAT). Secretaria de Atenção à Saúde (SAS): Departamento de Ações Programáticas Estratégicas (DAPE). Área Técnica de Saúde do Trabalhador.
- 2- Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Brasília. Política Nacional de Saúde do Trabalhador. 2000; 48.
- 3- Ministério da Saúde. Doenças Relacionadas ao Trabalho. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília/DF. 2001;114.
- 4- Ministério da Saúde. Doenças Relacionadas com o Trabalho: Diagnóstico e Condutas - Manual de Procedimentos para os Serviços de Saúde. OPS Capítulo 2:1-12.
- 5- Rey, L. Dicionário de Termos Técnicos de Medicina e Saúde. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 1999.
- 6- Fundação Getúlio Vargas - FGV. Dicionário de Ciências Sociais. Rio de Janeiro. 1987.
- 7- Schilling, R.S.F. More effective prevention in occupational health practice. Journal of the Society of Occupational Medicine. 1984; 39:71-9.
- 8- Ministério da Previdência Social - MPAS. Lei nº 8.212, de 24 de julho de 1991. Diário Oficial de 25/07/1991 Dispõe sobre a organização da seguridade social, institui de plano de custeio, e das outras providências. 1991:14801.
- 9- Last, J.M. Dictionary of Epidemiology. Oxford : Oxford University Press. 3rd. 1995
- 10- Mendes, R. Asbesto (amianto) e doença: revisão do conhecimento científico e fundamentação para uma urgente mudança da atual política brasileira sobre a questão. Rio de Janeiro. 2001 Jan-Fev; 17 (1):7-29.
- 11- Política nacional de Segurança da Saúde do Trabalhador. Brasília. Versão pronta após sugestões – 29.12.2004. Citado em 24/10/2008. <http://www.mte.gov.br/seg_sau/proposta_consultapublica.pdf> [online]
- 12- Ministério da Previdência Social. Brasil. Citado em 01/04/2009. <http://www1.previdencia.gov.br/aeps2006/15_01_03_01.asp>[Online].
- 13- Capelozzi, V.L. Asbestos, asbestosis and cancer: diagnostic criteria. J Pneumol. 2001; 27(4):206-218.

- 14- Mendes, R., Patologia do Trabalho. s.l. : Sarvier.
- 15- Ministério da Saúde. Série A. Normas e manuais técnicos. Saúde do trabalhador. Protocolos de complexidade diferenciada. 2006; 2:31.
- 16- Castro;H.A.; Gonçalves, K.S.; Vicentin, G. Estudo das internações hospitalares por pneumoconioses no Brasil, 1984-2003. Rev Bras Epidemiol. 2005; 8(2): 150-60.
- 17- International Labour Organization - ILO. Resolution Concerning Asbestos (Adopted by the 95th Session of the International Labour Conference, 2006 June) Geneva:International Labour Organization.
- 18- World Health Organization - WHO. Elimination of Asbestos-Related Diseases. Geneva:World Health Organization, 2006. Citado em 28/07/2007. http://www.who.int/occupational_health/publications/asbestosrelateddiseases.pdf [Online]
- 19- International Labour Organization - ILO. C162 Asbestos Convention, 1986. Citado em 14/06/2008 <http://www.itcilo.it/actrav/osh_es/m%f3dulos/legis/c162.htm> [Online].
- 20- Virta RL. Mineral Commodity Profiles—Asbestos. Circular 1255-KK. Reston, VA:U.S. Geological Survey. 2005.
- 21- Mendes, R. Asbesto (amianto) e doença. Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro. 2001 Jan-Fev. 17(1):7-29.
- 22- Lemen, R. A.. Call for an international ban on asbestos: Why asbestos should be banned. American Journal of Industrial Medicine. 2000; 37:236-237.
- 23- Castro, H.; Giannasi, F.; Novello, C. A luta pelo banimento do amianto nas Américas: uma questão de saúde pública. Ciência & Saúde Coletiva. 2003; 8 (4):903-911.
- 24- Nishikawa,K.; Takahashi,K.; Karjalainen, A.; Chi-Pang Wen; Furuya, S.; Hoshuyama, T.; Todoroki, M.; Kiyomoto, Y.; Wilson,D.; Higashi, T.; Ohtaki, M.; Pan G. and Wagner, G. Recent Mortality from Pleural Mesothelioma, Historical Patterns of Asbestos Use, and Adoption of Bans: A Global Assessment. Environmental Health Perspectives. 2008 Dec; 16 (12).

- 25- Hodgson JT, McElvenny DM, Darnton AJ, Price MJ, Peto J. The expected burden of mesothelioma mortality in Great Britain from 2002 to 2050. *Br J Cancer*, 2005; 92:587-93.
- 26- Certified causes of death in patients with mesothelioma In.: England, S.E.; Okello, C.; Treasure, T.; Nicholson, A.G.; Peto, J. and Møller, H.. *BMC Cancer*. 2009; 9:28.
- 27- Peto J, Decarli A, La Vecchia C, Levi F, Negri E. The European mesothelioma epidemic. *Br J Cancer*. 1999; 79:666-672.
- 28- Peto J, Hodgson JT, Matthews FE, Jones JR. Continuing increase in mesothelioma mortality in Britain. *Lancet*. 1995; 345:535-539.
- 29- Castro; H.A.; Gonçalves, K.S.; Vicentin, G.. Estudo das internações hospitalares por pneumoconioses no Brasil, 1993-2003 Hospital admissions due to pneumoconiosis in Brazil, 1993-2003. *Rev Bras Epidemiol* 2007; 10(3): 391-400.
- 30- Algranti, E. Epidemiologia das doenças ocupacionais respiratórias no Brasil. *Epidemiologia das doenças respiratórias* 2001; 1(3): 119-43.
- 31- Algranti E, Freitas JBP, Mendonça EMC, DeCapitani EM, Silva HC, Bussacos MA. Non- Malignant Asbestos- Related Diseases In Brazilian Asbestos-Cement Workers. *Am J Ind Med*. 2001; 40: 240-54.
- 32- MS/FNS. Manual de Normas para o Controle das Pneumoconioses. Brasília; 1997.
- 33- Giannasi F, Thébaud-Mony A. Occupational Exposures to Asbestos in Brazil. *Int J Occup Environ Health*. 1997; 3(2): 150-7.
- 34- Bezerra OMPA, Dias EC, Galvão MAM, Carneiro APS. Talcose entre artesãos em pedra-sabão em uma localidade rural do Município de Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil. *Cad Saúde Pública*. 2003; 19(6): 1751-9.
- 35- Nussbaumer, L. e Dapper, V. Investigação de Óbitos por Mesotelioma no Rio Grande do Sul, 1999 a 2003. *Bol. Epidemiológico*. Edição especial. 2007 Mar; 1(9).
- 36- Mogami R, Marchiori E, Albuquerque HA, Ribeiro P, Capone D. Correlação entre radiografia convencional e tomografia computadorizada de tórax em trabalhadores da indústria têxtil do asbesto. *Rev Imagem*. 2001; 23 (4): 233-8.
- 37- Instituto Nacional do Câncer - INCA. Citado em: 15/01/2008. <http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=15>. [Online]

- 38- Associação Brasileira dos Expostos a Amianto - ABREA. Citado em: 15/01/2008. <<http://www.abrea.org.br/06historia.htm>>. [Online]
- 39- Asbesto/Amianto no Brasil. Um Grande Desafio. Giannasi, F. Caderno Centro de Recursos Humanos da Bahia da Universidade Federal da Bahia (UFBA). Salvador. 2005 Jul., 128-140.
- 40- Becklake, M. Asbestos-Related Diseases. [comp.] Stellman J.M. Geneva : International Labour Office, 1998. 4th Ed. (J.M. Stellman, org.). 10-50.
- 41- Instituto Brasileiro do Crisotila. Citado em: 03/02/2008. <<http://www.crisotilabrasil.org.br/site/oAmianto/index.php>>. [Online]
- 42- Ministério do Trabalho, Brasil. Limites de Tolerância para Poeiras Minerais - Asbestos. Portaria nº1, de 28/05/1991, altera o Anexo nº12 da Norma Regulamentadora nº15, que institui os "limites de tolerância para poeiras minerais - asbestos". [Diário Oficial da União, 29/05/1991].
- 43- De Capitani, E.M. Alterações pulmonares e pleurais causadas pela exposição ao asbesto: uma revisão. J Pneumol.1994; 20:207-218.
- 44- Scliar, C. Amianto: Mineral Mágico ou Maldito? Ecologia Humana e Disputa Política-Econômica. Centro de Documentação e Informação - CDI. 1998; (1):142.
- 45- Nunes, J.S.M. Importância econômico-social e estratégica do amianto no contexto brasileiro. Revista Brasileira de Saúde Ocupacional. 1998; 16(63): 4-37.
- 46- Wunsch Filho, V.; Neves, H.; Moncau, J.E. Amianto no Brasil: Conflitos Científicos e Econômicos. ---Rev Ass Med Brasil. 2001; 47(3): 259-61.
- 47- Centro de Vigilância Sanitária. Listados no anexo II do Decreto 2.172/97] Citado em 01/04/2009. <http://www.cvs.saude.sp.gov.br/li_doen.asp> [Online]
- 48- International Agency for Research on Cancer - IARC. Silica Some Silicates Coal Dust and Para-Aramid Fibrils. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. 1997; (38).
- 49- World Health Organization - WHO. Environmental health criteria 203: chrysotile asbestos. WHO. 1998.
- 50- OSHA - Occupational Safety & Health Administration. Department of Labor Occupational Safety & Health Administration., 14 de Outubro de 2005. Citado em: 05/02/2007. <<http://www.osha.gov>>. [Online]

- 51- Goldman, L. e Ausiello, D.G. Tratado de medicina interna. Rio de Janeiro : Elsevier, 2005; 22.
- 52- Saúde e Trabalho. Citado em: 13/03/2008. <<http://www.saudeetrabalho.com.br/download/pulmonares-bagatin.pdf>>. [Online]
- 53- Capelozzi1,V.L.; Saldiva, P.H.N. Diagnósticos histopatológicos das pneumoconioses. J Bras Pneumol. 2006; 32(1):99-112.
- 54- Meirelles, G.S.P., et al. Placas pleurais relacionadas com o asbesto: Revisão da Literatura. Revista Portuguesa de Pneumologia. 2005 Set-Out; (XI).
- 55- Agency for Toxic Substances and Disease Registry - ATSDR. Resumen de salud pública asbesto (Asbestos). 2001. Citado em 15/02/2009. <http://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs61.html#expos [Online]
- 56- Instituto nacional do Cancer - INCA. Citado em 19/04/2009. <http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?ID=15> [Online].
- 57- Gottlieb, L.S. The Range of Medical Abnormalities Resulting from Asbestos Exposure (An Overview). In: Asbestos Medical Research. Sourcebook on Asbestos Diseases: Medical, Legal and Engineering.(G.A. Peters & B.J. Peters, orgs.). 1989; (4):1-35.
- 58- Altin, R., et al. Antioxidant Response at Early Stages and Low Grades of Simple Coal Worker's Pneumoconiosis Diagnosed by High Resolution Computed Tomography. Int. J. Environ. Health. 2004; (207): 455-462.
- 59- Castro, H.A. Busca de Marcadores Inflamatórios IL-1 β , IL-6 e TNF- α em Trabalhadores Expostos a Poeiras Minerais. Tese apresentada na Escola Nacional de Saúde Pública – FIOCRUZ para obtenção de título de doutor em Saúde Pública. 2000.
- 60- Rom WN, Basset P, Fells GA, Nukiwa T, Trapnell BC, Crysall RG. Alveolar macrophages release an insulin-like growth factor I-type molecule. J Clin Invest. 1988 Nov; 82(5):1685–1693.
- 61- Rom WN, Travis WD, Brody AR. Cellular and molecular basis of the asbestos-related diseases. Am Rev Respir Dis. 1991; 143:408-422.

- 62- Rosenthal, G.J.; Corsini, E. and Simeonova, P.. Selected New Developments in Asbestos Immunotoxicity. *Environmental Health Perspectives*. 1998; 106 (1).
- 63- Kamp DW, Dunn MM, Sbalchiero JS, Knap AM, Weitzman SA. Contrasting effects of alveolar macrophages and neutrophils on asbestos-induced pulmonary epithelial cell injury. *Am J Physiol* 266 (Lung Cell Mol Physiol 10). 1994; 84-91. In: Rosenthal, G.J.; Corsini, E. and Simeonova, P.. Selected New Developments in Asbestos Immunotoxicity. *Environmental Health Perspectives*. 1998; 106 (1).
- 64- 64. MC Dermott, M. F., Aksentijevich, I. e Galon, J., et al. Germline Mutations in the Extracellular Domains of the 55 kDa TNF Receptor, TNFR1, Define a Family of Dominantly Onherited Autoinflammatory Syndromes. *Cell*. 1999; 97(1):133-144.
- 65- Piguet, P. F.; Collart, M.A. e Grau, G. E. SAPPRequirement of Tumor Necrosis Factor for Development of Silica-Induced Pulmonary Fibrosis. *Nature.*, 1990; 344: 245-247.
- 66- Zhang Y, Lee TC, Guillemin B, Yu MC, Rom WN. Enhanced IL- I,B and TNF-a release and messenger RNA expression in macrophages from idiopathic pulmonary fibrosis or after asbestos exposure. *J Immunol*. 1993; 150:4188-4196.
- 67- Lemaire I, Ouellet S. Distinctive profile of alveolar macrophage-derived cytokine release induced by fibrogenic and nonfibrogenic mineral dusts. *J Toxicol Environ Health*. 1996; 47:465-478.
- 68- Standiford TJ, Kunkel SL, Phan SH, Rollins BJ, Strieter RM. Alveolar macrophage derived cytokines induced monocyte chemoattractant protein 1 expression from human pulmonary type II like epithelial cells. *J Biol Chem*. 1991; 266:9912-9920. In: Rosenthal, G.J.; Corsini, E. and Simeonova, P.. Selected New Developments in Asbestos Immunotoxicity. *Environmental Health Perspectives*. 1998; 106 (1).
- 69- Lanier LL, Phillips JH, Hackett J, Tutt M, Kumar V. Natural killer cells: definition of a cell type rather than a cell function. *J Immunol*. (1986) 137:2735-2739.
- 70- Tsang PH, Chu FN, Fischbein A, Bekesi G. Impairments in functional subsets of T suppressor (CD8) lymphocytes, monocytes, and natural killer cells among asbestos exposed workers. *Clin Immunol Immunopath*. 1988; 47:323-332.
- 71- Al Jarad N, Gellert AR, Rudd RM. Bronchoalveolar lavage and 99mTc-DTPA clearance as prognostic factors in asbestos workers with and without asbestosis. *Respir Med*. 1993; 87:365-374.

- 72- Rom WN, Travis WD. Lymphocyte-macrophage alveolitis in nonsmoking individuals occupationally exposed to asbestos. *Chest*. 1992; 101:779-786.
- 73- Citado em 28/04/2009.
<<http://www.tudoresidenciamedica.hpg.ig.com.br/estudar/consensofisiopatoasma.htm>>. [Online]
- 74- Gurer-Orhan, H., Sabir, H.U. e Özgünes, H. Correlation Between Clinical Indicators of Lead Poisoning and Oxidative Stress Parameters in Controls and Lead-Exposed Workers. *Toxicology*. 2004; 195: 147-154.
- 75- Nadif, R., et al. Relations Between Occupational Exposure to Coal Mine Dusts, Erythrocyte Catalase and the Severy of Coal Worker's Pneumoconiosis. *Occup. Environ. Med.* 1998; 55: 533-540.
- 76- Nadif, R., et al. Effect of TNF and LTA Polymorphisms on Biological Markers of Response to Oxidative Stimuli in Coal Miners: a Model of Gene-Environment Interaction. *J. Med. Genet.* 2003; 40: 96-103.
- 77- Engelen, J. J. M., Borm, P. J. A. e Van Sprundel, M. et al. Blood Antioxidant Parameters at Different Atages of Pneumoconiosis in Coal Workers. *Environ. Health Perspect.* 1990; 84:165-172.
- 78- Barreiros, A.L.B.S.; David, J.M.; David, J.P. Oxidative stress: relations between the formation of reactive species and the organism's defense. *Química Nova*. 2006 Fev; 1(29):113-123.
- 79- Öztürk, O. and Gümüslü, S. Age-Related Changes of Antioxidant Enzyme Activities, Glutathione Status and Lipid Peroxidation in Rat Erythrocytes After Heat Stress. *Life Science*. 2004; 75:1551-1565.
- 80- Menegon, A., Board, P. G., Blackburn, A. C., Mellick, G. D. L. E., Couteur, D. G. Parkinson-s Disease, Pesticides, and Glutathione Transferase Polymorphisms. *The Lancet*. 1998; 352:1344-1346.
- 81- Matés, J. M., Péres-Gómes, C., Castro, I. N. Antioxidant Enzymes and Human Diseases. *Clin Biochem*. 1999; 32(8):595-603.
- 82- Amdur, M. O., Doull, J., Klaasen, C. D. Casarett and Doull's Toxicology. New York: Pergamon Press, 1991.
- 83- Kamp DW, Graceffa P, Pror WA, Weitzman SA. The role of free radicals in asbestos-induced diseases. *Free Radical Biology & Medicine*. 1992; 12:293-315.

- 84- Hardy JA, Aust AE. The effect of iron binding on the ability of crocidolite asbestos to catalyze DNA single-strand breaks. *Carcinogenesis*.1995; 16:319-325.
- 85- Kamp DW, Israbian VA, Preusen SE, Zhang CX, Weitzman SA. Asbestos causes DNA strand breaks in cultured pulmonary epithelial cells: role of iron-catalyzed free radicals. *Am J Physiol*. 1995; 268 (Lung Cell Mol Physiol 12):471-480.
- 86- Simeonova PP, Luster MI. Iron and reactive oxygen species in the asbestos-induced tumor necrosis factor- α response from alveolar macrophages. *Am J Resp Cell Mol Biol*. 1995; 12:676-683.
- 87- Ghio AJ, Kennedy TP, Whorton AR, Crumbliss AL, Hatch G, Hoidal JR. Role of surface complexed iron in oxidant generation and lung inflammation induced by silicates. *Am J Physiol*. 1992; 263:511-518.
- 88- Simeonova PP, Luster MI. Asbestos induction of nuclear transcription factors and interleukin 8 gene regulation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1996; 15:787-795.
- 89- Simeonova PP, Toriumi W, Kommineni C, Erkan M, Munson AE, Rom WN, Luster MI. Molecular regulation of IL-6 activation by asbestos in lung epithelial cells: role of reactive oxygen species. *J Immunol*. 1997; 159:3921-3928.
- 90- Ramos-Nino, M.E.; Testa, J.R.; Altomare, D.A.; Pass, H.I.; Carbone, M.; Bocchetta, M. and Mossman, B.T. Cellular and Molecular Parameters of Mesothelioma. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2006; 98:723–734.
- 91- Shukla A, Gulumian M, Hei T, Kamp D, Rahman Q, Mossman B. Multiple roles of oxidants in the pathogenesis of asbestos-induced diseases. *Free Rad Biol Med*. 2003; 34(9):1117–1129.
- 92- Ribeiro, L.R. *Mutagenese Ambiental*. Editora SBMCTA, 1º Edição, 2003.
- 93- Boice, J.H. e Lubin Jr., J.D. Lung Cancer Risk From Residential Radon: Meta-analysis of Eight Epidemiologic Studies. *Journal of the National Cancer Institute*. 1997; 89(1): 49-57.
- 94- Clayson, D.B, et al. Early indicators of potential neoplasia produced in the rat forestomach by non-genotoxic agents: the importance of induced cellular proliferation. *Mutat. Res*. 1991; 248(2): 321-31.

- 95- Albertini, R.J.; Anderson, D.; Douglas, G.R.; Hagmar, L.; Hemmink, K.; Merlo, F. et al.. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *Mutational Research*. 2000; 463: 111-172.
- 96- Hattacharya, K. Biomarkers in risk assessment of asbestos exposure. *Mutation Research*. 2005; 579: 6-25.
- 97- International Atomic Energy Agency - IAEA. Biological Dosimetry: chromosomal aberration analysis for dose assessment. 1986; 9-12.
- 98- Celik, A. e Akbas, E. Evaluation of sister chromatid exchange and chromosomal aberration frequencies in peripheral blood lymphocytes of gasoline station attendants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2005; (60): 106-112.
- 99- Hagmar, L., et al. The usefulness of cytogenetic biomarkers as intermediate endpoints in carcinogenesis. *Int. J. Hyg. Environ. Health*. 2001; 204: 43-47.
- 100- Fenech, M. The in vivo micronucleus technique. *Mutat. Res*. 2000; 455: 81-95.
- 101- M. Lohani, E. Dopp, H.H. Becker, K. Seth, D. Schiffmann, Q. Rahman, Smoking enhances asbestos induced genotoxicity, relative involvement of chromosome 1: a study using multicolor FISH with tandem labeling. *Toxicol. Lett*. 2002; 136: 55–63.
- 102- Singh, et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cell. *Exp. Cell. Res*. 1988; (175):184-191.
- 103- Topinka, J., Loli, P., Dusinská, M., Hurbánková, M., Kováčiková, Z., Volkovová, K., Kazimírová, A., Barancoková, M., Tatrai, E., Wolff, T., Oesterle, D., Kyrtopoulos, S.A., Georgiadis, P.. Mutagenesis by man-made fibres in the lung of rats. *Mutation Research*. 2006; 595: 174-183.
- 104- Speit, G.. Appropriate in Vitro Test Conditions for Genotoxicity Testing of Fibers. *Inhalation Toxicology*. 2002; 14:79–90.
- 105- Zhao XH, Jia G, Liu YQ, Liu SW, Yan L, Jin Y, Liu N. Association between polymorphisms of DNA repair gene XRCC1 and DNA damage in asbestos-exposed workers. *Biomed Environ Sci*. 2006 Jun; 19(3):232-8.
- 106- Altin, R., Armutcu, F., Kart, L., Savranlar, A and Özdemir, H. Antioxidant Response at Early Stages and Low Grades of Simple Coal Worker's Pneumoconiosis Diagnosed by High Resolution Computed Tomography. *Int. J. Environ. Health*. 2004; 207:455-462.

- 107- Nadif, R., Bourkard, E., Dusch, M., Bernadac, P., Bertrand, J. P., Mur, J. M. and Pham, Q. T. Relations Between Occupational Exposure to Coal Mine Dusts, Erythrocyte Catalase and the Severy of Coal Worker's Pneumoconiosis. *Occup. Environ Med.* 1998; 55:533-540.
- 108- Evelo, C. T. A., Bos, R. P and Borm, P. J. A. Decresed Glutathione Content and Glutathione S-transferase Activity in Red Blood Cells of Coal Miners hit Early Stages of Pneumoconiosis. *Br J. Ind Med.* 1993; 50: 633-636.
- 109- International Labour Organization – ILO. Guidelines for the Use of the ILO International Classification of Radiographs of Pneumoconioses. rev.ed. Occupational Safety and health series. Geneva, 2000; 22.
- 110- Centers for Disease Control - CDC. Preventing Silicosis and Deaths in Construction Workers. Cincinnati/USA, 1996.
- 111- American Thoracic Society – ATS. Adverse effect of crystalline silica exposure. *Am J. Respir. Crit. Care Med.* 1997; 155: 761–765.
- 112- Aebi, H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984; 15:121-126.
- 113- Habig, W. H., Jakoby, W. B. Assay for Differentiation of Glutathione S-Transferases. *Methods Enzymol.* 1981; 77:398-405.
- 114- Da Silva, J., et al. An alkaline single-cell gel electrophoresis (comet) assay for environmental biomonitoring with native rodents. *Genetics and Molecular Biology.* 2000; 23(1): 241-245.
- 115- Lima RC, Victora CG, Dall'Agnol M, Facchini LA, Fassa A. Associação entre as características individuais e sócio-econômicas e os acidentes do trabalho em Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. *Cad Saude Publica.* 1999; 15(3):569-80.
- 116- Zangirolani, L.T.O.; Cordeiro, R.; De Medeiros, M.A.T.; Stephan, C. Topologia do risco de acidentes do trabalho em Piracicaba, SP. Spatial distribution of risks for work-related injuries in a city of Southeastern e Brazil. *Rev Saúde Pública;* 2008; 42(2):287-93.
- 117- Sjöberg L, Drottz-Sjöberg BM. Knowledge and risk perception among nuclear power plant employees. *Risk Anal.* 1991; 11:607-18.
- 118- Castro, H.A., Gomes, V.R.B. Doenças do Aparelho Respiratório Relacionadas à Exposição ao Asbesto: *Rev. Pulmão. RJ.* 1997; 3(6):162-170.

- 119- Bagatin E. Morbidade e mortalidade entre trabalhadores expostos ao asbesto na atividade de mineração; 1940-1996 . Campinas: UNICAMP/USP/ UNIFESP/Fundacentro; 2002. Citado 27/09/2002. <<http://www.crisotilabrasil.org.br/pesquisa%20da%20unicamp%20resumo%20informativo.pdf>> [Online].
- 120- Speit G, Trenz K, Schütz P, Rothfuss A, Merk O. The influence of temperature during alkaline treatment and electrophoresis on results obtained with the comet assay. *Toxicol Lett.* 1999 Oct;110(1-2):73-8.
- 121- Dušinská,M.; Collins,A.; Kažimírová, A.; Barančoková, M.; Harrington, V.; Volkovová, K.; Staruchová, M.; Horská, A. Wsóllová, L.; Kořcan, A.; Petrík, J.; Machata, M.; Ratcliffe, B. and Kyrtopoulos, S. Genotoxic effects of asbestos in humans. *Mutation Research.* 2004; 553:91–102.
- 122- Dušinská, M.; Dzupinková, Z.; Wsóllova, L.; Harrington, V. and Collins, A.R. Possible involvement of XPA in repair of oxidative DNA damage deduced from analysis of damage, repair and genotype in a human population study. *Mutagenesis.* 2006; 3(21):205–211.
- 123- Piperakis. S. M.; Kontogianni, K.; Karanastasi, G.; Iakovidou-Kritsi, Z. and Piperakis, M. M. The use of comet assay in measuring DNA damage and repair efficiency in child, adult, and old age populations. *Cell Biol Toxicol.* 2009; 25:65–71.
- 124- Singh, N.P.; Danner, D.B.; Tice, R.R.; Brant, L. and Schneider, E.L.. DNA damage and repair with age in individual human lymphocytes. *Mutation Research.* 1990; 237:123-130.
- 125- Møller, P. Assessment of reference values for DNA damage detected by the comet assay in human blood cell DNA. *Mutation Research.* 2006; 612: 84–104.
- 126- Da Silva, J.; De Freitas, T.R.O.; Heuser, V.; Marinho, J.R. and Erdtmann, B. Genotoxicity Biomonitoring in Coal Regions Using Wild Rodent *Ctenomys torquatus* by Comet Assay and Micronucleus Test. *Environmental and Molecular Mutagenesis.* 2000; 35:270-278.
- 127- Heuser, V.D.; Da Silva, J.; Moriske, H.; Dias, J.F.; Yoneama, M.L. and De Freitas, T.R.O. Genotoxicity Biomonitoring in Regions Exposed to Vehicle Emissions Using the Comet Assay and the Micronucleus Test in Native Rodent *Ctenomys minutus*. *Environmental and Molecular Mutagenesis.* 2002; 40:227–235.

- 128- S.W. Maluf, D.F. Passos, A. Bacelar, G. Speit, and B. Erdtmann. Assessment of DNA damage in lymphocytes of workers exposed to X-radiation using the micronucleus test and the comet assay, *Environ. Mol. Mutagen.* 2001; 38:311– 315.
- 129- Franko, A.; Dolz'an, V.; Arneric', N.; Dodic'-Fikfak, M.. The Influence of Genetic Polymorphisms of GSTP1 on the Development of Asbestosis. *JOEM.* 2008; 50 (1).
- 130- Zhai, R.; Liu, G.; Ge, X.; Yang, C; Huang, C.; Wu, C. and Christiani, D.C. Genetic Polymorphisms of MnSOD, GSTM1, GSTT1, and OGG1 in Coal Workers' Pneumoconiosis. *Journal of Occupational and Environmental Medicine.* 2002; 44(4).
- 131- Nadif, R., Jedlicka, A., Mintz, M., Bertrand, J-P., Kleeberger, S. and Kauffmann, F. Effect of TNF and LTA Polymorphisms on Biological Markers of Response to Oxidative Stimuli in Coal Miners: a Model of Gene-Environment Interaction. *J. Med. Genet.* 2003; 40: 96-103.
- 132- Lewczuk E, Owczarek H. The role of oxygen free radicals in asbestos cytotoxicity. *Med Pr.* 1992; 43(4):335-42.
- 133- Cemeli E, Baumgartner A, Anderson D. Antioxidants and the Comet assay. *Mutat Res.* 2008; 681(1):51-67.
- 134- Hashimoto, K.; Takasaki, W.; Yamoto, T.; Manabe, S.; Sato, I. and Tsuda, S. Effect of glutathione (GSH) depletion on DNA damage and blood chemistry in aged and young rats. *The Journal Toxicology Sciences.* 2008; 4(33):421-429.
- 135- Franko, A.; Dolzan, V.; Arneric, N. and Dodic-Fikfak, M. Asbestosis and catalase genetic polymorphism. *Arh hig rada toksikol.* 2008; 59:233-240.
- 136- Evelo,C.T.A.; Bos, R.P.; Borm, P.J.A.. Decreased glutathione content and glutathione S-transferase activity in red blood cells of coal miners with early stages of pneumoconiosis. *British Journal of Industrial Medicine.* 1993; 50:633-636.
- 137- Menegon, A., Board, P. G., Blackburn, A. C., Mellick, G. D. L. E., Couteur, D. G. Parkinson-s Disease, Pesticides, and Glutathione Transferase Polymorphisms. *The Lancet.* 1998; 352:1344-1346.
- 138- Matés, J. M., Péres-Gómes, C., Castro, I. N. Antioxidant Enzymes and Human Diseases. *Clin Biochem.* 1999; 32(8):595-603.
- 139- Amdur, M. O., Doull, J., Klaasen, C. D. Casarett and Doull's Toxicology. New York: Pergamon Press, 1991.

- 140- Franko, A.; Dolzan, V.; Arneric, N. and Dodic-Fikfak, M. The Influence of Genetic Polymorphisms of GSTP1 on the Development of Asbestosis. *JOEM*. 2008; 50(1).
- 141- Craighead J. E. Eyes for the epidemiologist: the pathologist's role in shaping our understanding of the asbestos- associated diseases. *Am J Clin Pathol*. 1988; 89:281-87.
- 142- Keretsetse GS, Laubscher PJ, Du Plessis JL, Pretorius PJ, Van Der Westhuizen FH, Van Deventer E, Van Dyk E, Eloff FC, Van Aarde MN, Du Plessis LH. DNA Damage and Repair Detected by The Comet Assay in Lymphocytes of African Petrol Attendants: A Pilot Study. *Ann Occup Hyg*. 2008; 52(7):653-62.
- 143- Lu Y, Morimoto K. Exposure level to cigarette tar or nicotine is associated with leukocyte DNA damage in male Japanese smokers. *Mutagenesis*. 2008; 23(6):451-5.
- 144- Zalata, A.; Yahia, S.; El-Bakary, A. e Elsheikha, H.M.. Increased DNA damage in children caused by passive smoking as assessed by comet assay and oxidative stress. *Mutation Research*. 2007; 629: 140-147.
- 145- Mak, J.C.W.; Ho, S.P.; Yu, W.C.; Choo, K.L.; Chu, C.M.; Yew, W.W.; Lam, W.K. and Chan-Yeung, M.. Polymorphisms and functional activity in superoxide dismutase and catalase genes in smokers with COPD. *European Respiratory Journal*. 2007; 30: 684–690.
- 146- Chan-Yeung M, Ho SP, Cheung AH, So LK, Wong PC, Chan KK, Chan JW, Ip MS, Mak JC. Polymorphisms of glutathione S-transferase genes and functional activity in smokers with or without COPD. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2007; 11(5):508-14.
- 147- Osinubi, O.Y.O; Afilaka, A.A.; Doucette, J.; Golden, A.; Soriano, T.; Rovner E. and Anselm, E. Study of Smoking Behavior in Asbestos Workers. *American Journal of Industrial Medicine*. 2002; 41:62-69.
- 148- Churg A, Stevens B. Enhanced retention of asbestos fibers in the airways of human smokers. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995; 151:1409-1413.
- 149- Bernard, A. e Lauwerys, R. Present status and trends in biological monitoring of exposure to industrial chemicals. *J. Occup. Med*. 1986; (28):558-62.
- 150- Dusinska, M. and Collins, A.R. The comet assay in human biomonitoring: gene–environment interactions. *Mutagenesis*. 2008; 1–15.