



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA
SERGIO AROUCA
ENSP

“Implementação da Técnica de Avaliação de Aberrações Cromossômicas e sua Aplicação em Indivíduos Expostos a Solventes e Metais”

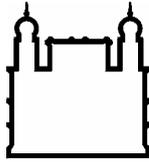
por

Marcos Massao Murata

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 2007.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA
SERGIO AROUCA
ENSP

Esta dissertação, intitulada

“Implementação da Técnica de Avaliação de Aberrações Cromossômicas e sua Aplicação em Indivíduos Expostos a Solventes e Metais”

apresentada por

Marcos Massao Murata

foi avaliada pela Banca Examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Adriano Caldeira de Araujo

Prof. Dr. Jefferson Jose Oliveira Silva

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

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

M972i Murata, Marcos Massao

Implementação da técnica de avaliação de aberrações cromossômicas e sua aplicação em indivíduos expostos a solventes e metais. / Marcos Massao Murata. Rio de Janeiro: s.n., 2008.
xiii, 60 p., il., tab., graf.

Orientador: Mattos, Rita de Cássia Oliveira da Costa
Dissertação de Mestrado apresentada à Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca

1. Aberrações Cromossômicas. 2. Avaliação. 3. Exposição Ocupacional. 4. Exposição Ambiental. 5. Intoxicação por Chumbo. 6. Solventes-toxicidade 7. Metais-toxicidade. I. Título.

CDD - 22.ed. - 615.92

AGRADECIMENTOS

Agradeço fundamentalmente a minha família que sempre me deu base e estrutura em todos os sentidos para trilhar com tranquilidade na minha formação acadêmica

Agradeço também aos meus amigos que junto com minha família contribuem sempre para uma tranqüila atmosfera ao meu redor e desta forma me tornam mais forte nas adversidades e muito mais alegre e feliz nos sucessos

Agradeço a minha orientadora que me guia desde os tempos da graduação auxiliando nos passos a serem tomados bem como a toda equipe do Laboratório de Toxicologia do CESTEHE, no setor de Indicadores de Efeito (Carlúcio, Helena, Gabriela, Leandro, Márcia, Íris, Simone, Daniele, Ely e Mário) que participaram do processo como um todo auxiliando diretamente nas análises e ao setor de Metais (destacando Regina, Sayonara e Diego)

Destaco aqui um agradecimento em especial a minha co-orientadora, Sandra Stuckenbruck Otto, que foi de fundamental importância para o meu ingresso no campo citogenético da pesquisa, tendo total abertura, disponibilidade, e paciência para meu aprendizado.

Agradeço ao Instituto de Radiologia e Dosimetria (IRD) representado pelo grupo de pesquisa do Dr Carlos Eduardo Bonacossa e da pesquisadora Monica Stuck, formado ainda por Léo, Hugo, Amanda, Samira, do setor Demin, que exerceu um papel muito importante em meu aperfeiçoamento no campo da citogenética através da abertura para troca de idéias e uma satisfatória interação.

Agradeço a todos os voluntários que participaram do estudo contribuindo para a execução de uma idéia elaborada em conjunto, (orientadora, co-orientadora e aluno), que objetivou enriquecer e auxiliar de alguma forma no desenvolvimento da Saúde Pública.

SUMÁRIO

| | | |
|------------|---|--------------------------------------|
| 1 | AGRADECIMENTOS..... | iv |
| 2 | RESUMO | vii |
| 3 | ABSTRACT | viii |
| 4 | FICHA CATALOGRÁFICA..... | Erro! Indicador não definido. |
| 5 | LISTA DE ABREVIATURAS..... | ix |
| 6 | LISTA DE TABELAS | x |
| 7 | LISTA DE FIGURAS..... | xi |
| 1 | INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1 | Testes Citogenéticos | 1 |
| 1.2 | Genotoxicidade e substâncias químicas..... | 3 |
| 1.3 | Aberrações cromossomiais | 4 |
| 1.4 | Atividades de trabalho..... | 6 |
| 1.4.1 | Pintores..... | 6 |
| 1.4.2 | Trabalhadores de Laboratório..... | 8 |
| 1.5 | Solventes e metais..... | 9 |
| 1.5.1 | Solventes..... | 9 |
| 1.5.2 | Metais | 10 |
| 2 | OBJETIVOS | 17 |
| 2.1 | Objetivo geral | 17 |
| 2.2 | Objetivos específicos | 17 |
| 3 | MATERIAL E MÉTODO | 18 |
| 3.1 | Material..... | 18 |
| 3.1.1 | Reagentes..... | 18 |
| 3.1.2 | Vidrarias e outros materiais | 18 |
| 3.2 | População | 19 |
| 3.3 | Método | 19 |
| 3.3.1 | Coleta e transporte das amostras de sangue periférico | 20 |
| 3.3.2 | Técnica de cultura..... | 21 |
| 3.3.3 | Coleta das células | 23 |
| 3.3.4 | Preparo das lâminas | 24 |
| 3.3.5 | Coloração das lâminas | 25 |
| 3.3.6 | Análise das metáfases ao microscópio..... | 25 |
| 3.4 | Análise estatística | 26 |
| 4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 27 |
| 4.1 | Dados Sócios Demográficos | 27 |
| 4.2 | Indicadores Biológicos de Exposição a Metais..... | 28 |
| 4.3 | Indicadores Citogenéticos..... | 33 |
| 5 | CONCLUSÕES | 45 |
| 6 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 47 |

ANEXO 1 **52**
ANEXO 2 **v**

RESUMO

Durante as últimas décadas, biomarcadores citogenéticos em linfócitos de sangue periférico têm sido usados para avaliar a exposição ocupacional a agentes carcinogênicos ou mutagênicos. A preocupação sobre os efeitos dos agentes genotóxicos nas populações humanas expostas ocupacionalmente, acidentalmente ou por estilo de vida tem crescido. Alterações cromossômicas induzidas em linfócitos humanos são biomarcadores bem estabelecidos de exposição ocupacional e ambiental a agentes genotóxicos. Participaram do estudo trabalhadores de um Estaleiro e de um Laboratório de Análises Tóxicológicas onde foram analisadas alterações citogenéticas em linfócitos de sangue periféricos, bem como indicadores biológicos de exposição aos metais chumbo e manganês. Os indicadores de exposição ao chumbo apresentaram as seguintes alterações: diferença significativa entre os grupos estudados nos níveis dos indicadores ALA-U, Pb-S, correlação significativa entre % de recuperação da ALAD e Pb-S no grupo Estaleiro e 22,2% dos trabalhadores deste grupo que apresentaram % de recuperação da ALAD acima do Índice Biológico Máximo indicando que o grupo Estaleiro apresenta exposição ocupacional ao chumbo. A exposição ao manganês deve ser mais bem estudada, pois embora os resultados da exposição não sejam conclusivos, os trabalhadores do grupo Estaleiro apresentam uma diferença perto da significância ($p=0,075$) dos níveis de Mn em sangue em relação ao outro grupo e apresentam uma alta frequência de pneumonia ocupacional, uma das doenças causadas pela exposição ao manganês. A alta frequência de aneuploidias no grupo Estaleiro indica risco de desenvolvimento de processos de carcinogenicidade neste grupo. Com relação ao grupo Laboratório, os resultados do presente estudo não evidenciam uma forte associação das alterações citogenéticas versus exposição. É fundamental que um maior número de trabalhadores sejam avaliados, mas é importante ressaltar a necessidade de um programa de prevenção da exposição profissional e um controle efetivo dos aspectos ambientais. A aneuploidia se correlacionou fortemente com as outras alterações citogenéticas demonstrando ser importante ferramenta na avaliação da genotoxicidade. Existe uma evidência da relação da exposição ao metal chumbo com o aparecimento da alteração citogenética SPC no grupo Estaleiro, pois foi encontrada uma correlação bastante significativa entre o indicador de exposição ao chumbo % de rec de ALAD e esta alteração citogenética. Os resultados dos testes χ^2 revelam que os trabalhadores avaliados neste estudo apresentam alterações citogenéticas diferentes do controle do estudo de Major, Jakab e Tompa, 1999, indicando que estão expostos ocupacionalmente a substâncias clastogênicas, em especial o grupo Estaleiro. Os indicadores genotóxicos podem não analisar de forma específica a exposição a substâncias químicas, mas estabelecem fortes associações com a exposição a estas, devendo ser incluídos como uma ferramenta independente na avaliação de risco toxicológico.

ABSTRACT

During the last decades cytogenetic biomarkers in peripheral blood lymphocytes have been used in the assessment of occupational exposure to carcinogenic or mutagenic agents. The concern about genotoxic agents effects in human population with occupational exposure, accidentally or because of lifestyle has been increasing. Chromosomal alterations induced in human lymphocytes are well established biomarkers of occupational and environmental exposure to genotoxic agents. Shipyard workers and research laboratories workers were evaluated in this study. Cytogenetic alterations and others biological indicators of exposure to Pb and Mn were analyzed. The lead exposure indicators showed some alterations like significant difference between studied groups in ALA-U, and Pb-S levels, significant correlation between %ALAD and Pb-S on Shipyard group, and 22,2% workers from this group showed %ALAD above the maximum biological rate indicating that this group is lead occupationally exposed. The Mn exposure should be more studied, despite the fact that results from these analysis are not conclusive, Shipyard workers showed difference near to significance ($p=0,075$) in Mn-S levels in comparison with the other group, and showed a high frequency of occupational pneumonia, one of the illness caused by manganese. The high frequency of aneuploidy in the Shipyard group indicates the risk of development of carcinogenesis process on this group. The researcher laboratories workers results didn't suggest a strong association between cytogenetic alteration and exposure. It is fundamental that a bigger number of workers should be evaluate, but is important to emphasize the need of a prevention program on professional exposure and an effective control of environmental aspects. Aneuploidy correlated in a strongly way with others cytogenetic alterations showing to be an important tool on the genotoxic assessment. There is an evidence of the relationship between lead exposure and appearance of the cytogenetic alteration SPC on the Shipyard group, because it was found a significant correlation between % ALAD and incidence of SPC. The χ^2 test results showed that workers evaluated in this study presented different frequencies of cytogenetic alterations from controls of Major, Jakab and Tompa 1999 study, indicating that they are occupationally exposed to clastogenic substances. The genotoxic indicators may be not analyze in a specific way the chemicals exposure, but they established strong associations with its exposure, and should be included as and independent tool on the toxicological risk assessment.

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|--------|--|
| AC | Aberrações cromossomiais |
| ALAD | Enzima ácido delta aminolevulínico desidratase |
| ALA-U | Ácido delta aminolevulínico em urina |
| CESTEH | Centro de Estudos da Saúde do Trabalhador e da Ecologia Humana |
| EPI | Equipamento de proteção individual |
| IBM | Índice Biológico Máximo |
| MN | Micronúcleo |
| Mn-S | Manganês em sangue |
| Pb-S | Chumbo em sangue |
| PHA | Fitohemaglutinina |
| SCE | Troca de cromátides irmãs |
| SPC | Separação prematura centromérica |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|-----------|
| Tabela 1 Principais substâncias envolvidas nos processos de trabalho de Pintura e de Laboratório | 9 |
| Tabela 2 – Ocupações e atividades que mais comumente contaminam trabalhadores | 13 |
| Tabela 3- Principais Indicadores Biológicos utilizados na Avaliação de exposição ao chumbo | 15 |
| Tabela 4 - Indicadores Biológicos de exposição a metais. Valores médios, mínimos e máximos..... | 32 |
| Tabela 5: Indicadores Citogenéticos Valores Médios, Mínimos e Máximos. | 39 |
| Tabela 6: Frequências das alterações citogenéticas esperadas e observadas no grupo Estaleiro e em todos os indivíduos em linfócitos | 43 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|-----------|
| Figura 1 Ferramentas utilizadas na avaliação da exposição a substâncias químicas. | 4 |
| Figura 2: A-Os meios de cultura ;B-a estufa na qual são incubados; C capela de fluxo laminar onde é realizado o processo de preparação dos meios..... | 22 |
| Figura 3- As culturas prontas para serem retiradas da estufa e o tratamento das células após a cultura..... | 24 |
| Figura 4 Gráficos Box-Plot demonstrando a distribuição das alterações citogenéticas nos dois grupos. Os gráficos referem-se respectivamente ao número de aneuploidias, SPCs e ACs respectivamente..... | 35 |
| Figura 5 Imagem A-Metáfase normal(46 cromossomos), Imagem B- Metáfase com SPCs de forma generalizada..... | 36 |
| Figura 6 Correlações significativas entre os indicadores citogenéticos, aneuploidia x SPC e aneuploidia xAC respectivamente (n=19; média aneuploidia =5,7 +/- 6,0; média SPCs=2,74 +/-5,5; média AC= .42 +/-0,84) | 41 |

INTRODUÇÃO

Muitos carcinógenos humanos são genotóxicos, mas nem todos os agentes genotóxicos têm demonstrado serem carcinogênicos em humanos. Embora o principal interesse de diversos estudos seja associar a genotoxicidade com a carcinogenicidade, existe um interesse inerente no monitoramento genotóxico humano independente do câncer como desfecho. Embora a exposição a uma variedade de diferentes carcinógenos possa ser usada analisando indicadores de exposição, o processo de toxicidade nem sempre pode ser identificado sem equívocos porque a variabilidade interindividual afeta estes indicadores. Apesar dos indicadores de exposição, em especial os de dose interna, serem químicos-específicos não traduzem o real potencial tóxico das substâncias químicas. Os indicadores genotóxicos podem não analisar de forma específica, mas estabelecem fortes associações com a exposição a estas substâncias, devendo ser incluídos como uma ferramenta independente na avaliação de risco toxicológico¹.

Testes Citogenéticos

Os testes citogenéticos utilizam células cultivadas ou retiradas de animais ou indivíduos submetidos a uma exposição experimental, profissional, terapêutica ou acidental a xenobióticos e outras como radiação. São detectados dois tipos de substâncias mutagênicas: as que produzem aberrações cromossômicas estruturais- substâncias clastogênicas e as que interferem na formação do fuso mitótico, provocando alterações na distribuição dos cromossomos durante a divisão celular e causando aneuploidias, as chamadas aberrações numéricas.²

A aneuploidia é a situação em que o número de cromossomos não é um múltiplo exato do número haplóide característico da espécie. A trissomia é uma

aneuploidia relativamente comum, sendo causada por uma não disjunção, de modo que alguns gametas contêm dois de um determinado cromossomo. Nos seres humanos foi avaliado que aproximadamente 4% de todas as gestações clinicamente identificadas possuem alguma forma de trissomia para cada um dos cromossomos. As trissomias autossômicas totalizam 47% de todos os fetos anormais. Entre as trissomias mais comuns estão a trissomia do 21, 18 e 13 e entre as aberrações sexuais estão as síndromes de Klinefelter e Turner³. A aneuploidia foi descrita pela primeira vez em tumores pelo biólogo alemão Theodor Boveri, em 1914, e desde então vem sendo estudada.

Durante as últimas décadas, biomarcadores citogenéticos em linfócitos periféricos têm sido usados para avaliar a exposição ocupacional a agentes carcinogênicos ou mutagênicos. O primeiro método em uso analisava aberrações cromossomiais (AC). De forma geral é aceito que mutações cromossômicas são eventos causais no desenvolvimento de neoplasia, e desde cedo postulado, mas não provado, que o aumento em danos nos cromossomos pode refletir um aumento no risco de câncer. Duas técnicas menos laboriosas, troca de cromátides irmãs (SCE) e micronúcleo (MN), foram introduzidas mais tarde na avaliação da saúde ocupacional. SCE representam trocas simétricas entre cromátides irmãs; geralmente não resultam em alteração na morfologia do cromossomo. MN representa um pequeno núcleo adicional formado da exclusão de fragmentos de cromossomo ou por cromossomos inteiros restantes da mitose. Conseqüentemente, a frequência de micronúcleo indiretamente reflete quebras cromossômicas ou não pareamento no processo de mitose. O significado na saúde de níveis aumentados de SCE e MN é pouco entendido⁴.

A utilidade destas técnicas citogenéticas na implementação de medidas preventivas nos locais de trabalho depende de como elas servem como bons indicadores de exposição como também se pode prever risco para câncer ou não⁴.

Genotoxicidade e substâncias químicas

A genotoxicidade está relacionada a capacidade de uma determinada substância química alterar a estrutura do DNA celular, como resultado de uma ou mais alterações, incluindo mutações gênicas, deleções, rearranjos cromossômicos e quebras simples e duplas⁵. O monitoramento genético de populações humanas expostas a potenciais carcinógenos é um sistema de aviso prévio para doenças genéticas ou câncer⁶. A preocupação sobre os efeitos dos agentes genotóxicos nas populações humanas expostas ocupacionalmente, acidentalmente ou por estilo de vida tem crescido. Um dos métodos diretos existentes é a medição de mudanças ocorridas no DNA que podem ser visualizadas através dos cromossomos (aberrações cromossomiais) no microscópio óptico⁷. Alterações cromossomiais induzidas em linfócitos humanos são biomarcadores bem estabelecidos de exposição ocupacional e ambiental a agentes genotóxicos⁶. Desta maneira, os efeitos genéticos destas exposições são avaliados através da verificação de alterações cromossomiais em linfócitos do sangue periférico⁷. Pessoas com elevadas frequências de AC nos linfócitos de sangue periférico têm elevado risco de desenvolver câncer⁸. A Figura 1 apresenta o processo de avaliação da exposição a substâncias químicas. A investigação das Aberrações Cromossomiais se enquadra neste processo como uma ferramenta classificada como indicador biológico de efeito. Embora esta alteração não seja específica fornece informações toxicológicas importantes que em conjunto com as outras ferramentas estimam o risco a substâncias químicas.



Figura 1 Ferramentas utilizadas na avaliação da exposição a substâncias químicas.

Aberrações cromossomiais

As aberrações cromossômicas (AC) em linfócitos de sangue periférico têm sido usadas desde o século XX em programas de avaliação da saúde de trabalhadores expostos a agentes mutagênicos e carcinogênicos. Tem sido proposto que a frequência de AC em linfócitos de sangue periférico pode servir não só como indicador de exposição a mutagênicos, como também indicador de danos genéticos com relevância no processo carcinogênico⁴. Há uma ampla evidência de seu valor como indicador na identificação do perigo ocupacional e ambiental como, por exemplo, trabalhadores expostos ocupacionalmente a substâncias como benzeno e outros solventes orgânicos têm uma maior incidência de AC em comparação a população em geral⁹. Estas alterações citogenéticas são também utilizadas como

indicadores de efeitos precoces nos estudos de monitoramento biológico em população exposta a diversos agentes genotóxicos¹⁰.

As ACs constituem uma fração relevante do dano causado por agentes físicos, químicos e biológicos ao material genético. Muitos compostos capazes de causar mutações gênicas também causam mutações cromossômicas. Entretanto, substâncias como o benzeno, atuam apenas em nível cromossômico, não sendo, portanto, detectadas pelos testes que usam bactérias como sistema indicador. Assim, é imprescindível a inclusão dos testes citogenéticos na avaliação do potencial mutagênico de um composto².

Os linfócitos de sangue circulante de mamíferos, inclusive o homem, é um ótimo sistema para se avaliar uma substância quanto a sua capacidade em produzir aberrações cromossômicas. A técnica serve também para o monitoramento de populações expostas a fármacos, seja por razões profissionais, terapêuticas ou por acidente. Supondo-se que haja uma correlação entre o dano induzido no sangue e em outras células somáticas, os linfócitos serviriam como um sistema sentinela para grupos de alto risco². Os linfócitos periféricos humanos representam uma população de células que está predominantemente num estágio pré-sintético de DNA (fase G0) na qual as atividades bioquímicas e fisiológicas são mínimas.

A capacidade dos linfócitos de permear por diversos órgãos e retornar a circulação através de um pool de recirculação permite assim uma visão ampla do efeito genotóxico no organismo¹¹. Ao serem colocados em cultura, na presença de fitohemaglutinina (PHA) são estimulados, sintetizam RNA, proteína e DNA; após 48 horas estão, na maioria, em sua primeira mitose. Este período varia um pouco conforme a composição do meio de cultura. Parece que a PHA estimula,

principalmente, os linfócitos T, que constituem de 60 a 70% da população total de linfócitos, mas os B também são estimulados².

Outro tipo de alteração é a chamada separação prematura centromérica (SPC), que acontece com a separação de centrômeros durante a pró-metáfase/metáfase no ciclo celular mitótico, e tem sido investigada por alguns grupos de pesquisa na sua relação com algumas doenças como Síndrome de Down como também com neoplasias. A seqüência normal de separação centromérica tem sido estabelecida e padrões alterados foram detectados em muitas doenças. SPC pode ser uma anomalia citogenética dominante. Outros dados publicados demonstram que algumas substâncias químicas podem induzir SPC em diferentes tecidos adultos normais. SPC foi também encontrada em linfócitos de sangue periférico tratados in vitro com uma mistura de quinze pesticidas usados comumente. SPC está envolvida em mecanismos patológicos de aneuploidias, e isto parece ser uma possível manifestação de instabilidade nos cromossomos em síndromes de quebras nos cromossomos. Instabilidade nos cromossomos ocorre frequentemente também em linfócitos de sangue periférico de humanos ambientalmente ou ocupacionalmente expostos a agentes clastogênicos, e é considerado um fator etiológico de doenças neoplásicas. Os dados existentes sugerem que SPC não é incidental, e que é associada com a carcinogênese. Conseqüentemente, SPC pode ter importância na avaliação de risco para câncer¹².

Atividades de trabalho

Pintores

Tintas são misturas de três principais ingredientes: pigmentos, veículos e aditivos. Pigmentos usados em tintas incluem pigmentos inorgânicos como o preto

carbono e o titânio dióxido, como também pigmentos orgânicos. A maioria dos pigmentos orgânicos é preparada de azo, antraquinona e tintas triarilmetano, e fitalocianinas. A produção de tintas consiste na dissolução ou dispersão de resinas em solventes orgânicos ou óleos para produzir veículos, misturando e dispersando o pigmento ou tinta no veículo, introdução de aditivos. Alguns ou todos estes estágios podem ser feitos manualmente ou de forma automatizada em processos contínuos ou isolados. Durante a produção de tintas, exposição a pigmentos, veículos e aditivos podem ocorrer através de inalação ou contato com a pele durante a mistura e dispersão, e também durante a limpeza dos misturadores. A exposição é maior com tintas líquidas do que em pasta. Historicamente, alguns trabalhadores em ambas as fabricações de tintas e em pinturas eram expostos a níveis muito altos de chumbo, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e benzeno do que hoje, e o desenvolvimento e uso de tecnologias modernas de controle possivelmente marcou uma redução em exposições a misturas de tintas e solventes. Um grande número de dados epidemiológicos lida com o risco potencial para câncer em processos de pintura. Devido à presença de um grande número de estudos de corte e caso-controle, foi considerado que não há benefício em considerar estudos descritivos baseados em simples tabulações de morte, certificados de causa de morte, e comentários de ocupação. Em qualquer caso, estes estudos não provaram claramente os resultados¹³. Pela natureza de seu trabalho, pintores são expostos a numerosas substâncias químicas contidas em tintas e removedores, em particular solventes. Os efeitos dos solventes nos pulmões ocorrem relativamente com exposições curtas, entretanto, os efeitos no sistema nervoso central podem ser agudos ou demandar muitos anos.

Tintas podem ser aplicadas por diferentes métodos, variando de aplicações manuais com escova, rolo ou spray a processos completamente automatizados.

Processos automatizados têm o potencial de proteger completamente os trabalhadores de qualquer exposição tóxica. Alguns processos automatizados não são possíveis por muitas circunstâncias devido ao custo ou por serem impraticáveis. A única possibilidade é limitar a exposição melhorando a ventilação do local, proteção respiratória pessoal, ou tintas seguras. O entendimento dos diferentes processos e sistemas de pintura é essencial para a avaliação correta da exposição ocupacional a tintas e sua toxicidade. Em geral, o maior risco na exposição a substâncias químicas é qualquer processo com aerossóis ¹⁴.

Segundo o documento da IARC ¹³, existem evidências limitadas de que a exposição ocupacional em processos de pintura é carcinogênica e evidências inadequadas para animais de experimentação. Assim, o IARC classifica esta atividade como possivelmente carcinogênicas.

Trabalhadores de Laboratório

Poucos estudos têm sido publicados a respeito do monitoramento citogenético em trabalhadores de laboratório. Destes, alguns têm mostrado um aumento na frequência de células com alterações citogenéticas em profissionais regularmente expostos a substâncias químicas em ambientes de laboratório de pesquisa. Por outro lado, Narod et al, que estudaram o grupo de um laboratório federal canadense, não encontraram mudanças significativas na frequência de células com MN; entretanto, não há referência sobre AC¹⁰.

A Tabela 1 apresenta as substâncias químicas mais presentes nos ambientes de trabalho dos pintores e dos técnicos de Laboratório.

Tabela 1 Principais substâncias envolvidas nos processos de trabalho de Pintura e de Laboratório

| | <i>Pintura</i> | <i>Laboratório</i> |
|--------------------|--|--|
| Substâncias | Tolueno, xileno, acetona, cromato de zinco, Acetato de mercúrio, resinas epóxi, resinas fenólicas, metil metacrilato, azidrinhas | Metanol, Acetonitrila, etanol, hexano, ácido acético, carbamatos, organoclorados |

Solventes e metais

Solventes

Os solventes orgânicos e seus vapores são elementos comuns em nosso ambiente. Exposições acidentais curtas a concentrações baixas dos vapores de solventes como gasolina, fluídos de isqueiro, sprays aerossóis e removedores de manchas podem ser relativamente inofensivas; entretanto, as exposições aos removedores de tintas, alvejantes de pisos e azulejos e outros solventes domésticos ou industriais podem ser perigosas. Além disso, o descarte de alguns destes produtos químicos não tem sido efetuado adequadamente; por essa razão, há vazamentos em depósitos de lixo tóxico e contaminação de água potável. Como muitos trabalhadores da indústria estão expostos aos solventes e vapores, esforços significativos têm sido efetuados no sentido de determinar os níveis seguros de exposição. Um destes solventes orgânicos é o tolueno que é muito usado como solvente de tintas, vernizes, colas, esmaltes e produtos de laca e como intermediário químico das sínteses de outros compostos orgânicos. O tolueno é depressor do Sistema Nervoso Central (SNC), e em concentrações baixas causam fadigas, fraqueza e confusão¹⁵. Outro

efeito do tolueno que tem sido observado possui relação com sua genotoxicidade como estudado em Pelclova et al ¹⁶ e Gaikwad et al ¹⁷.

Outro solvente também bastante utilizado e que inspira preocupação é o benzeno. O benzeno é considerado um carcinógeno humano, é clastogênico para roedores e humanos. Trabalhadores podem estar ocupacionalmente expostos a solventes aromáticos, como o benzeno, resultando de atividades variadas onde a substância é processada, gerada ou usada⁶. O benzeno é um importante poluente presente no meio ambiente em geral como também ocupacional existindo indicativo que seja genotóxico¹⁸.

Metals

O advento da era industrial e da mineração em larga escala trouxe uma série de doenças ocupacionais, principalmente as que são originadas pelos metais. Os metais produzem seus efeitos tóxicos combinando-se com um ou mais grupos reativos essenciais às funções fisiológicas normais. Um metal com uma grande importância toxicológica que, portanto pode servir de exemplo é o chumbo. Na maioria dos países em desenvolvimento, a exposição ao chumbo permanece ainda um sério problema de saúde pública, pois, não existem programas de controle das emissões ^{19,20}. O chumbo é usado em importantes processos industriais e como consequência de sua persistência no meio ambiente tornou-se de grande preocupação para Saúde Pública. O chumbo é um dos metais pesados mais estudados, cuja toxicidade é reconhecida há muitos séculos e o mais abundante de sua classe na crosta terrestre. Tem sido utilizado desde os tempos pré-históricos, por isso amplamente distribuído e mobilizado no ambiente. Pode ser usado tanto na sua forma pura como também acompanhado de outros metais ou compostos químicos. A importância comercial do chumbo está baseada em sua facilidade de fundição, alta densidade,

baixo ponto de fusão, baixa resistência, facilidade de fabricação, resistência a ácidos, alta reatividade eletroquímica com o ácido sulfúrico, e estabilidade química com ar, água e solo²¹.

Antes da revolução industrial, a exposição de populações humanas ao chumbo ambiental era baixa, mas a partir do aumento da industrialização e com a larga escala de mineração esta contaminação passou a ser um sério problema de saúde pública sendo. Atualmente, esta contaminação ambiental é relativamente mais alta do que a causada por outros metais não-essenciais, sendo que a capacidade físico-química deste elemento contribui muito para este fato. Em termos globais, a utilização extensiva do chumbo nos processos industriais, tem liberado para o ambiente cerca de 300 milhões de toneladas do metal nos últimos cinco milênios, sendo que os últimos 500 anos foram responsáveis pela maior quantidade desta poluição²⁰.

Nos últimos vinte anos, a exposição e, conseqüentemente, os níveis de chumbo em sangue da população em geral vêm decaindo substancialmente. A causa mais significativa é a substituição da gasolina aditivada (alquil-chumbo), que promoveu decréscimo imediato sobre os níveis de chumbo no ar (Pb-Ar) e uma redução paralela na média da concentração de chumbo em sangue. Outros fatores que contribuem para esta redução são: a diminuição do uso de soldas em embalagens de alimentos enlatados, o controle da água potável e das emissões industriais. Os valores de plumbemia média da população geral, nestes últimos anos, nos EUA, Japão e Europa Setentrional foram reduzidos quase à metade, encontrando-se níveis máximos de 15-20µg/dL e, em alguns locais, valores inferiores a 10µg/dL²¹.

Uma pesquisa conduzida pela Organização Pan-americana de Saúde (PAHO) na América Latina e no Caribe divulgou dados oriundos de estudos que avaliaram a exposição de chumbo em população em geral. De acordo com este estudo, no Brasil,

os níveis de Pb-S em adultos que viviam próximos a fontes fixas de emissão de chumbo eram de 27,2 µg/dL e para crianças 39,0 µg/dL. Embora estes dados foram obtidos a partir de um estudo piloto, demonstram uma prevalência alta de exposição de chumbo neste tipo de população¹⁹.

São inúmeras as atividades industriais que podem ocasionar contaminação ambiental pelo chumbo. Atualmente, as fábricas e reformadoras de baterias, reparadores de radiadores, fundições secundárias, incluindo refino de metais, constituem as principais fontes de contaminação ambiental e ocupacional do chumbo. O consumo mundial de chumbo cresceu especialmente no período de 1965-1990 e em 1990 foi de cerca de 5.6 x 10⁸ toneladas. Segundo Romieu et al¹⁹, no Brasil, em 1995, o total de chumbo produzido foi de 24 x 10³ toneladas por ano e o total de chumbo importado foi de 46.3 x 10³ 21. A Tabela 2 indica as ocupações e atividades que mais comumente contaminam os trabalhadores.

Tabela 2 – Ocupações e atividades que mais comumente contaminam trabalhadores

| GRAU DE RISCO | ATIVIDADES E PROFISSÕES |
|----------------------|--|
| ELEVADO | ◆ Fusão primária do mineral |
| | ◆ Fusão secundária ou recuperação de sucata |
| | ◆ Fabricação/recuperação de baterias |
| | ◆ Polimento e refinamento de metais |
| ELEVADO | ◆ Destruição de estruturas metálicas pintadas com tintas contendo chumbo |
| | ◆ Fabricação de tintas |
| | ◆ Fabricação/utilização de vernizes de esmaltes para cerâmicas |
| | ◆ Fabricação/reparo de radiadores para automóveis |
| MODERADO | • Fabricação de cabos telefônicos |
| | • Fabricação e decoração de vidros e cristais |
| | • Fabricação de armas e munições |
| | • Oficina de reparo de automóveis |
| | • Joalheiros |
| | • Instrutores de tiro (ambiente confinado) |
| | • Soldagem de circuitos na indústria eletrônica |
| | • Impressores, tipógrafos, linotipistas |
| | • Bombeiros hidráulicos/soldadores |
| | |

O chumbo afeta virtualmente todos os órgãos ou sistemas do organismo e os principais mecanismos envolvidos na toxicidade deste metal são os processos bioquímicos fundamentais. Os efeitos tóxicos são decorrentes principalmente da grande afinidade do metal com proteínas. Nesta interação o chumbo se liga reversivelmente aos grupamentos sulfidrilas, amino, carboxílico e fosfato, sendo encontrada a maior afinidade com os grupos sulfidrilas²¹.

Estas interações podem originar as seguintes alterações: 1) ligação a membranas celulares provocando a inibição do transporte ativo e aumentando a permeabilidade passiva; 2) alteração da integridade estrutural e funcional das enzimas por distorção da configuração da cadeia polipeptídica causada por essa ligação; 3) alteração das várias vias metabólicas em especial da fosforilação oxidativa por inibição do sistema de oxigenases de função mista, em particular o citocromo P450 e da biosíntese do grupo Heme²¹.

A semelhança do chumbo, em alguns aspectos, com o cálcio, e sua ação competitiva com este, afeta entre outros sistemas, a respiração mitocondrial. A interação com o cálcio pode modificar o funcionamento das células musculares lisas, o que pode explicar os sintomas encontrados no trato gastrointestinal, algumas alterações nervosas e cardiovasculares²¹.

O chumbo inorgânico pode afetar uma série de sistemas cujos efeitos serão dependentes do nível e do tempo de exposição. Essa toxicidade está sempre correlacionada principalmente a quatro sistemas: hematopoiético, nervoso, renal e gastrintestinal podendo afetar também o sistema reprodutivo, cardiovascular, além de possíveis efeitos carcinogênicos e mutagênicos²¹.

Compostos de chumbo têm sido classificados pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) como possíveis carcinógenos humanos (B1)¹³. A Tabela 3 apresenta os principais indicadores biológicos de exposição ao chumbo.

Tabela 3- Principais Indicadores Biológicos utilizados na Avaliação de exposição ao chumbo

| Indicadores | Tipo | Valor de referência |
|---|---------------------------|----------------------------|
| Acido δaminolevulinico urinário (ALA-U) | Indicador de efeito | 4,5 mg/g Cr |
| Percentual de recuperação da enzima ALAD (%ALAD) | Indicador de efeito | % maior que 40% |
| Chumbo em sangue (Pb-S) | Indicador de dose interna | 20 - 150 µg/L |

O manganês (Mn) é um elemento amplamente distribuído na crosta terrestre. Este metal ocorre naturalmente em diversos tipos de rochas, e não ocorre no ambiente como um metal puro, e sim combinado com outras substâncias: oxigênio, enxofre e cloro. Estas formas são sólidas e não evaporam.

Algumas partículas do material sólido podem se apresentar em: suspensão no ar, dissolvidos na água e baixos níveis desse composto se encontram presentes em lagos, oceanos e rios. O Mn é um elemento essencial e o corpo humano, sob condições normais, contém, geralmente, pequenas quantidades do metal. O metal pode ter sua concentração aumentada no ambiente, em função da atividade industrial e da decomposição de combustíveis fósseis. As concentrações de Mn que ocorrem naturalmente no ar são baixas, estando o metal presente sob diversas formas na atmosfera (carbonatos, hidróxidos ou óxidos de Mn). Aproximadamente 80% do Mn no material particulado estão associados a partículas que têm diâmetro menor que 5

μm , favorecendo a ampla distribuição do metal e a introdução no sistema respiratório²².

Populações residentes em áreas próximas a indústrias que utilizam o Mn ou áreas de descarte de materiais industriais podem estar expostas a altos níveis de material particulado, mas esta exposição é menor que os trabalhadores diretamente envolvidos em processos onde o metal está presente. Os níveis considerados normais de Mn são de 2-8 $\mu\text{g/dL}$ em sangue e 0,1-0,8 $\mu\text{g/dL}$ em urina. A contaminação do ambiente de trabalho pode ocorrer em todas as indústrias que utilizam o Mn, o que se dá, de acordo com a operação desenvolvida, sob a forma de aerodispersóides, do tipo poeira ou fumo. A exposição do trabalhador ao ambiente contaminado pode ocasionar o aparecimento de alterações orgânicas e, em algumas circunstâncias, de moléstia profissional irreversível, conhecida como manganismo. As poeiras podem tanto conter óxidos de Mn, como o metal presente nos óxidos de outros elementos, como permanganato de potássio, óxido de ferro e Mn e silicato de Mn. O aparelho respiratório é de importância primordial como via de introdução do Mn. A introdução, a retenção e a remoção do aerodispersóides do metal apresentam características comuns às de qualquer outro material particulado introduzido por tal via. Grande parte do Mn introduzido pela via respiratória pode atingir a mucosa gastrintestinal, como consequência da deglutição do material removido até a faringe, e ser absorvido²³.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar a exposição a substâncias químicas de trabalhadores que desenvolviam duas atividades laborais distintas, através da utilização de indicadores de exposição e de efeito, incluindo como ferramentas biológicas as alterações citogenéticas em linfócitos de sangue periférico, contribuindo assim para estimar o risco toxicológico

Objetivos específicos

- Implementar no Laboratório de Toxicologia do CESTEJ a metodologia de avaliação de aberrações cromossomiais em linfócitos de sangue periférico em humanos.
- Avaliar a frequência de alterações citogenéticas em linfócitos de sangue periférico em uma população exposta a substâncias químicas.
- Buscar associação da avaliação da frequência destas alterações com os indicadores clássicos de exposição de modo a estabelecer uma relação causal.
- Avaliar através de questionário sócio-econômico fatores que possam influenciar na frequência da presença de aberrações cromossomiais.

MATERIAL E MÉTODO

Material

Reagentes

Ácido acético glacial Vetec- 99,79%

Ácido clorídrico Vetec 38%

Álcool etílico 70%

Colchicina – Sigma 95%

Corante azur- eosina- azul de metileno segundo Giemsa - Merck

Fitohemaglutinina- Cultilab

KCl Isofarma 99,5%

Meio Ham F-10- Cultilab

NaHPO₄ .2H₂O Merck 99%

Na₂HPO₄ .2H₂O Vetec 99%

Soro fetal bovino- Cultilab

Vidrarias e outros materiais

Coplins

Erlenmeyers (50, 100ml)

Lâminas para microscopia com extremidade rugosa

Pipetador automático Accu-Jet

Pipetas automáticas (1ml)

Pipetas de vidro graduadas (5, 10ml)

Pipetas Pasteur

Provetas de vidro (500ml)

Tubos Falcon graduados (15ml)

Tubos com heparina (10ml)

População

Participaram do estudo, trabalhadores do setor de pintura do Estaleiro Brasfels, localizado no município de Angra dos Reis no Estado do Rio de Janeiro e trabalhadores de Laboratório do CESTEH/ENSP/FIOCRUZ. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fiocruz (parecer n° 3806, CAAE 0037-0-031.000-06).

Método

Os ensaios para os indicadores biológicos de exposição ao chumbo, enzima Ácido delta-aminolevulínico desidratase (ALAD), ácido delta-aminolevulínico (ALA-U) e chumbo em sangue (Pb-S) foram conduzidos no Laboratório de Toxicologia do CESTEH.

A determinação da atividade da enzima ALAD em eritrócitos foi realizada pelo método modificado proposto por Sakai *et al.*²⁴ por espectrofotometria/UV Visível a 555nm, através da quantificação do composto colorido produzido pela reação entre o reativo de Erlich's e o porfobilinogênio (PBG), formado pela ALAD a partir do substrato ALA. A atividade foi expressa em $\mu\text{Mol PBG}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$ de eritrócitos a 37°C, considerando para o método uma absorvitividade molar de $0,062\text{nM}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$. O percentual de recuperação da atividade da ALAD (% ALAD) corresponde a diferença entre a enzima ativada e a inativada, e foi calculada considerando a atividade da enzima ativada como 100%. O Índice Biológico Máximo (IBM) utilizado para a avaliação do % da ALAD foi de até 40%²¹.

A determinação da concentração de ALA-U foi realizada pelo método de Ogata & Taguchi²⁵ modificado, que consiste no uso de metilacetoacetato na etapa de

condensação e formação do ALA-pirrol, e do n-butanol para diminuir o número de interferentes encontrados na urina, impedindo a formação de outros pirróis. As amostras de urina foram mantidas congeladas até o momento da análise. Foi utilizada uma curva de calibração com cloridrato de ALA nas concentrações 2,5, 5, 10, 20 e 40 mg/mL. A Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC) foi realizada em coluna de fase reversa C18 (4,6 μ m x 4,0 mm x 150 mm) com a fase móvel de acetonitrila/KH₂PO₄ 50 mM, pH 2,5 na proporção 20:80, fluxo de 1 mL/min, temperatura do forno de 40°C e detecção U.V. a 260 nm. O tempo de corrida foi de 20 min, o loop de 20 μ L e o volume de injeção de 110 μ L. Os picos cromatográficos referentes ao ácido δ -aminolevulínico foram detectados com o tempo de retenção de 8 min.

Para as análises de Pb-S foi utilizado o Procedimento Operacional Padrão (POP) estabelecido pelo Setor de Metais do Laboratório de Toxicologia, sendo realizado por Espectrometria de Absorção Atômica Eletrotérmica, utilizando um equipamento Zeeman 5100, com um programador forno de grafite HGA-600 e um amostrador automático As-60, todos da Perkin-Elmer® (Norwalk, CT USA). Os principais parâmetros utilizados foram: comprimento de onda de 283,3nm, largura da fenda de 0,7nm, temperatura de injeção de 90°C, temperatura de secagem de 120°C, temperatura de pirólise de 1000°C e de atomização de 1900°C.

A técnica de avaliação de Aberrações Cromossômicas em linfócitos de sangue periférico envolve as seguintes etapas:

Coleta e transporte das amostras de sangue periférico

Primeiramente, foi feita a assepsia da área de coleta com álcool etílico à 70%. Foram coletados 5 ml de sangue venoso em tubo estéril contendo o anticoagulante heparina (sal sódico). O sangue era então homogeneizado, invertendo o tubo várias

vezes. Em seguida, os tubos foram codificados com identificação própria para cada indivíduo. O tubo foi então acondicionado em caixa de isopor contendo gelo reciclável e imediatamente levado ao laboratório onde a cultura foi iniciada.

Técnica de cultura

O sangue foi novamente homogeneizado sendo o tubo invertido várias vezes. Foram transferidos, com auxílio de pipeta Pasteur, 15 gotas de sangue total para frasco tipo erlenmeyer, com capacidade para 50 mL, contendo 5 mL de meio e cultura previamente preparado. Este meio foi preparado do seguinte modo:

Em um frasco contendo 100 mL de meio Ham's F-10 foram adicionados 25 mL de soro fetal bovino e 5 mL de PHA. Foram aliqüotados 5 mL em frascos tipo erlenmeyer e guardados a temperatura de 18°C até o dia do uso.

Todo o material utilizado na preparação dos meios de cultura foram esterilizada em autoclave por 20 minutos à 121 °C.

No dia do uso, os frascos contendo as culturas foram agitados levemente e incubados em estufa a 37°C por 45 horas e 20 minutos. Após este tempo, foi adicionado a cada cultura 0,15 mL (3 gotas) de solução de colchicina, na concentração de 0,16 mg/mL para interromper a mitose na fase de metáfase. As culturas foram incubadas novamente à 37 °C por mais 2 horas e 40 minutos.

Todo o procedimento de manipulação das amostras (preparo do meio e obtenção das células) foi realizado em capela de fluxo laminar, previamente desinfetada com álcool etílico à 70% e luz ultravioleta germicida por 15 minutos.

A



B



C



Figura 2: A-Os meios de cultura ;B-a estufa na qual são incubados; C capela de fluxo laminar onde é realizado o processo de preparação dos meios

Coleta das células

Após 48 horas de incubação, as culturas foram homogeneizadas e vertidas em tubos de centrífuga graduados, com capacidade de 15 mL. Os tubos foram centrifugados a 1000 rpm durante 20 minutos e o sobrenadante desprezado com o auxílio de pipeta Pasteur. Sob agitação mecânica, em agitador de tubos, foram adicionados a cada tubo 8 mL de solução hipotônica de KCl (0,075M), preparada no mesmo dia e previamente aquecida a 37°C.

As células foram incubadas em tubos com solução hipotônica por 20 minutos à 37°C, em estufa para aumentar o volume celular. Os tubos foram centrifugados à 1000 rpm por 20 minutos e o sobrenadante desprezado.

O fixador (80-20 metanol-ácido acético), preparado no momento do uso, foi adicionado sob agitação (agitador de tubos), gota a gota até completar o volume de 2 mL (aproximadamente 48 gotas), e depois rapidamente até o volume de 8 mL

Os tubos foram guardados em geladeira, por 24 horas, para possibilitar um melhor espalhamento celular. Após este período, os tubos foram centrifugados a 1000 rpm por 20 minutos e o sobrenadante desprezado. Foi então adicionado a cada tubo 3 mL de fixador sob agitação no agitador.

As células novamente foram centrifugadas, sob as mesmas condições e o sobrenadante novamente desprezado.

Foram adicionados 2 mL de fixador, sob agitação no Vórtex.

Os tubos foram centrifugados sob as mesmas condições anteriormente descritas e o sobrenadante desprezado.

As células foram ressuspensas com um pequeno volume de fixador, de 0,5 a 1,0 mL e, a concentração de células foi estimada visualmente na suspensão de modo que fosse adequada para o posterior preparo das lâminas. Armazenaram-se os tubos

com a suspensão das células a 18°C em congelador (freezer) por 3 dias, para melhorar o espalhamento celular.



Figura 3- As culturas prontas para serem retiradas da estufa e o tratamento das células após a cultura

O preparo das soluções e a coleta das células foram realizados em capela química

Preparo das lâminas

As lâminas foram imersas em detergente neutro e esfregadas com esponja macia de limpeza, de modo que um filme de água se formasse na superfície da lâmina após o enxágüe.

Então, as lâminas foram colocadas em recipiente próprio para coloração de lâminas, tipo Coplin, e deixadas de molho em mistura de etanol PA com 20% de ácido clorídrico concentrado PA, por tempo variável, mas nunca inferior a um dia.

Após enxaguar em água corrente por 5 minutos, os recipientes tipo Coplin com as lâminas em água destilada foram colocados em um recipiente contendo gelo.

Gotejou-se sobre uma lâmina molhada e gelada, com pipeta Pasteur 5 gotas da suspensão de células no fixador.

As lâminas secaram em contato com o ar, à temperatura ambiente, e o código de identificação do indivíduo foi registrado na lâmina.

Foi verificada a concentração das células e o espalhamento das metáfases na lâmina ao microscópio óptico, sob contraste de fase, e somente após, prosseguiu-se com o preparo das demais lâminas, geralmente em número de 3.

Coloração das lâminas

As lâminas foram coradas em recipiente do tipo Coplin contendo 130 ml de tampão fosfato (pH 6,8), e 4 ml de corante azur-eosina- azul de metileno segundo Giemsa (Merck art. 9203), por 4 minutos.

Preparou-se o tampão a partir da mistura de duas soluções 0,1M (totalizando 1 litro). O tampão tinha a seguinte composição: 8,9 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ em 500 ml de água destilada e 7,3 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ em 500 ml de água destilada. Depois de preparado o tampão foi armazenado em frasco escuro na geladeira.

As lâminas foram lavadas com água destilada depois de coradas e secas à temperatura ambiente e em contato com o ar.

Análise das metáfases ao microscópio

As metáfases nas lâminas foram analisadas em microscópio de luz, equipado com lentes oculares e lentes objetivas planocromáticas de 10X e de 100x com auxílio de um computador acoplado ao mesmo e a utilização do programa Metafer 4.

As células em metáfase foram localizadas com objetiva de 10X e, após a sua visualização, examinaram-se os cromossomos com objetivas de 100x, com óleo de imersão.

Foi analisada cada célula metafásica, contando o número de figuras (presença de fragmentos acêntricos), observando a morfologia dos cromossomos e a presença de aberrações estruturais do tipo cromatídica e cromossômica.

Sobre o número de células analisadas por indivíduo, Carrano e Natarayan recomendam examinar pelo menos 100 metáfases por indivíduo para avaliar a presença de aberrações estruturais em cultura de linfócitos humanos

Análise estatística

Varáveis biológicas relevantes no contexto desta análise citogenética, tais como, sexo, idade, tabagismo e consumo de álcool deverão ser observadas de modo que a constituição dos dois grupos seja o mais semelhante possível. Para tal controle foi aplicado um questionário.

Para comparação das médias entre os grupos foi utilizado o Teste-t- Student, e para comparação entre frequências foi utilizado o teste Chi-quadrado. Este teste focaliza quaisquer discrepâncias entre frequências observadas e frequências esperadas de uma variável determinada. A questão crucial corresponde ao fato de as discrepâncias entre essas frequências serem suficientemente grandes, ou seja, apresentarem um valor χ^2 alto, para serem qualificadas como um resultado raro. Um valor χ^2 alto é aquele que supera o valor de χ^2 crítico específico do nível de significância de 5% para o grau de liberdade da análise.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dados Sócios Demográficos

Participaram do estudo, 38 trabalhadores que foram divididos em dois grupos de acordo com a atividade laboral (Estaleiro e Laboratório). O grupo do Estaleiro foi composto por 18 trabalhadores todos do sexo masculino, sendo que 61,1% possuíam ensino fundamental incompleto, 22,2% informaram ser fumantes (média de 19 cigarros/dia) e 66,7% relataram ingerir bebida alcoólica socialmente. Quanto a atividade de trabalho 77,8% são pintores e 22,2% desenvolvem atividades de apoio a pintura de navios e plataformas petrolíferas. O tempo médio na atividade de trabalho varia de 2 anos a 30 anos (média= 14 anos). A média da carga horária de trabalho semanal foi de 47 horas com pequenas variações. Os EPIs (Equipamentos de Proteção Individual) são de acordo com a atividade descritos como de uso freqüente. A maior parte destes trabalhadores apresentou dermatoses, pneumopatias e problemas auditivos relacionados as atividades laborais e vêm passando por avaliações clínicas no ambulatório do CESTEJ. Relatam nunca terem feito uso de medicamentos anti-neoplásicos, embora vários citem uso de medicamentos para alergias respiratórias e dermatológicas, e em média fizeram exames de raio X a mais de um mês. Estes trabalhadores são expostos ocupacionalmente a tintas, vernizes e removedores, cuja composição apresenta substâncias (solventes: tolueno, xileno, acetona, hexametileno diisocianato, tolueno 2,4-diisocianato; turpentina e resinas epóxi, fenólicas e biocidas: óxidos, acetato de mercúrio, sulfato de manganês II) de ação irritante para pele e mucosas, podendo causar dermatites. Tais substâncias, quando inaladas, podem provocar distúrbios respiratórios, hepáticos, neoplasias e danos ao sistema nervoso central.

O grupo Laboratório foi composto por 20 trabalhadores sendo 14 do sexo feminino e 6 do sexo masculino, sendo que 65% possuíam ensino superior completo e 5% com fundamental completo. Este grupo era composto por 20% de fumantes ($x = 8$ cigarros/dia) e 70% ingerem bebida alcoólica socialmente. Quanto à atividade de trabalho 8 são técnicos de nível superior, 7 estudantes de pós-graduação, 4 técnicos de nível médio, e 1 auxiliar de serviços gerais. O tempo na função varia de 3 meses a 19 anos (média= 4,5 anos). A carga horária semanal teve média de 32 horas semanais. 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 a mais de um mês. Estes trabalhadores são expostos ocupacionalmente a solventes (hexano, metanol, etanol, acetonitrila), ácidos (acético, clorídrico, fosfórico, sulfúrico) e várias outras substâncias, como por exemplo padrões, mas em baixas concentrações.

Com relação ao hábito de fumar como também ao hábito de ingerir bebida alcoólica nenhum dos indivíduos, tanto do Estaleiro quanto do Laboratório, foi excluído do estudo.

Indicadores Biológicos de Exposição a Metais

A Tabela 2 apresenta os valores dos indicadores biológicos de exposição ao Pb e Mn. No grupo do Estaleiro, quatro trabalhadores (22,2%) tiveram o percentual de recuperação da enzima ALA-D (média=41,63%) igual ou acima do Índice Biológico Máximo (IBM) de 40%, adotado pelo Laboratório de Toxicologia baseado em estudos conduzidos no CESTEH ^{21,26}. A média para todo o grupo foi de 32,9%. A respectiva análise para o Laboratório não foi possível ser efetuada devido a problemas técnicos.

Os níveis de ALA-U apresentaram média de 1,66mg/g cr no grupo Estaleiro sendo que um trabalhador deste grupo apresentou nível de 4,22mg/g cr podendo demonstrar uma exposição ocupacional ao metal chumbo, pois está próximo ao Valor de Referência adotado pela Norma Reguladora (NR) 7 do Ministério do Trabalho (4,5mg/g cr). Este indicador de efeito ao chumbo apresentou diferença significativa entre os grupos ($p=0,039$). Este achado provavelmente reflete tipos e frequências de exposição diferentes entre os dois grupos.

O indicador de dose interna Pb-S (média 4,65 $\mu\text{g/dL}$) no grupo Estaleiro comportou-se de forma semelhante ao ALA-U, onde embora os valores estejam dentro do IBMP, ratificam a exposição ocupacional ao chumbo. Este indicador apresentou diferença significativa entre os grupos ($p<0,001$) corroborando com a indicação de exposição ocupacional no grupo Estaleiro.

Os trabalhadores do grupo Estaleiro têm um tempo médio de exposição de 14 anos e provavelmente tem uma carga corpórea moderada ao metal. O chumbo é um dos compostos das tintas e acumula-se nos ossos, sendo estes responsáveis por 90% da carga corpórea em adultos. Este metal é principalmente incorporado em ossos de rápido crescimento, como a tíbia, o fêmur, o rádio, onde compete com o cálcio. O osso serve de reservatório para o chumbo, assim como serve para o cálcio considerando a similaridade eletroquímica entre estes elementos. Desta forma, o organismo pode mobilizar o chumbo armazenado durante alguns eventos como períodos de estresse, febre, hipertireodismo, imobilização prolongada, gravidez, lactação e crescimento²⁷. Este chumbo armazenado nos ossos fica constantemente sendo liberado para o sangue, atingindo assim, os tecidos moles provocando nestes compartimentos diversos efeitos tóxicos. Neste estudo, foi encontrada uma correlação significativa ($r= 0,730$, $p=0,001$) entre Pb-S e percentual de recuperação da ALA-D

no grupo Estaleiro. Segundo Mattos²¹, trabalhadores expostos ao chumbo com níveis menores que 27,6 µg/dL apresentam correlações significativas ($r=0,467$, $p<0,05$) com o percentual de recuperação da ALA-D. Este fato demonstra a alta sensibilidade do indicador de efeito ALA-D em avaliar exposição ao metal. Assim, estes achados indicam também a exposição do grupo do Estaleiro ao metal chumbo.

Com relação à concentração de Mn-S, o grupo Estaleiro apresentou média de 10 µg/L (5,5- 15,3µg/L). No grupo Laboratório os valores encontrados foram 8,0 µg/L de média (4,5 e 16,1µg/L). O valor máximo do Laboratório foi considerado um valor estatisticamente discrepante do conjunto do grupo e, portanto, foi excluído. Assim sendo, foi encontrado uma diferença perto do nível de significância ($p=0,075$). Este achado pode representar uma exposição ocupacional do grupo Estaleiro. Segundo Apostoli²⁸, ainda há um hiato no que se refere aos Limites Biológicos seguros para a exposição ao Mn.. Este autor aconselha o uso de MnS para estudos populacionais de grupos expostos mas não indica como monitoramento biológico individual. Os Valores de Referências sugeridos pelo *site* Biolind²⁹ são de 3 a 10µg/L, entretanto sugere-se que estes devam ser condicionados ao consumo de café ou chá, fumo (tabaco), alimentação e região de residência. Portanto, uma avaliação mais precisa deve ser conduzida para se assegurar que o grupo Estaleiro seja considerado ocupacionalmente exposto. Este grupo, como já relatado, apresenta um alto índice de casos de pneumonia. Os alvos primários, após exposições crônicas ao manganês e seus compostos, são os pulmões e o cérebro. Alta incidência de pneumonia foi associada com concentrações acima de 210 mg/m³ de manganês no ambiente de trabalho²³. Portanto, estudos mais aprofundados devem ser realizados com o objetivo de estabelecer esta relação causal.

Com relação aos parâmetros hematológicos houve diferença significativa ($p=0,014$) entre os grupos quanto ao número de leucócitos por mm^3 de sangue. Não foram encontradas diferenças significativas entre número de linfócitos, nem de eosinófilos, embora o grupo Estaleiro já apresentasse reações de hipersensibilidade as tintas. Estes resultados devem ser investigados com mais cuidado, sugerindo-se a utilização de testes mais específicos.

Cabe ressaltar que não foi possível a determinação dos indicadores de exposição para as outras substâncias que poderiam estar presentes nas atividades dos dois grupos de trabalhadores porque o Laboratório de Toxicologia do CESTEJ passava, na ocasião, por uma reestruturação da sua infra-estrutura.

Tabela 4 - Indicadores Biológicos de exposição a metais. Valores médios, mínimos e máximos.

| | Grupo Estaleiro | | | | | Grupo Laboratório | | | | |
|-----------------------------------|------------------------|---------|-----------------|--------|---------|--------------------------|---------|-----------------|--------|---------|
| | n | Médias | DP ³ | Mínimo | Máximo | n | Média | DP ³ | Mínimo | Máximo |
| ALAD Inativada¹ | 18 | 1431,89 | 385,15 | 930,24 | 2299,09 | 20 | 1301,84 | 299,06 | 766,35 | 2007,44 |
| % rec ALAD² | 18 | 32,87 | 9,63 | 1,05 | 43,52 | 20 | . | . | . | . |
| ALAU (mg/g cr) | 18 | 1,67** | 0,82 | 0,77 | 4,22 | 20 | 1,18** | 0,47 | 0,04 | 2,02 |
| Pb-S em ug/dL | 18 | 4,65*** | 1,73 | 1,90 | 9,10 | 20 | 2,08*** | 0,91 | 0,90 | 3,80 |
| Mn-S em ug/L | 18 | 10,0*** | 2,64 | 5,45 | 15,30 | 20 | 8,81*** | 3,08 | 4,46 | 16,11 |

1- A atividade foi expressa em μmol de peofobilinogênio / hora / L de hematócrito a 37°C

2- % recuperação (rec) de ALAD corresponde ao % da diferença entre a atividade da enzima inativada e a ativada (após tratamento com DTT)

3- DP=desvio padrão

** p=0,039

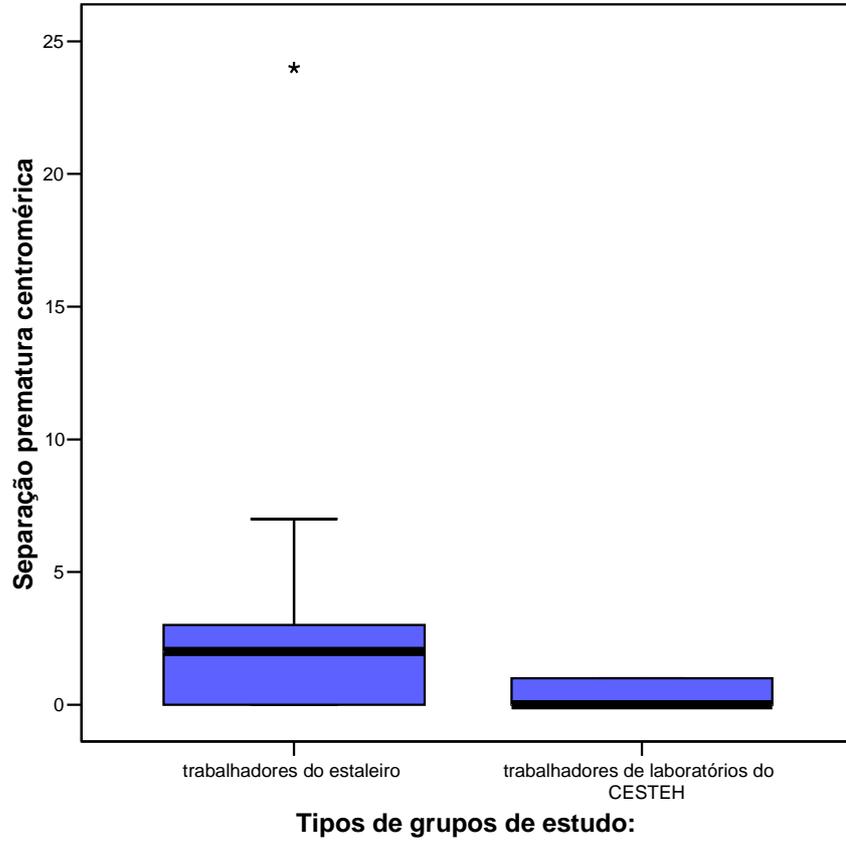
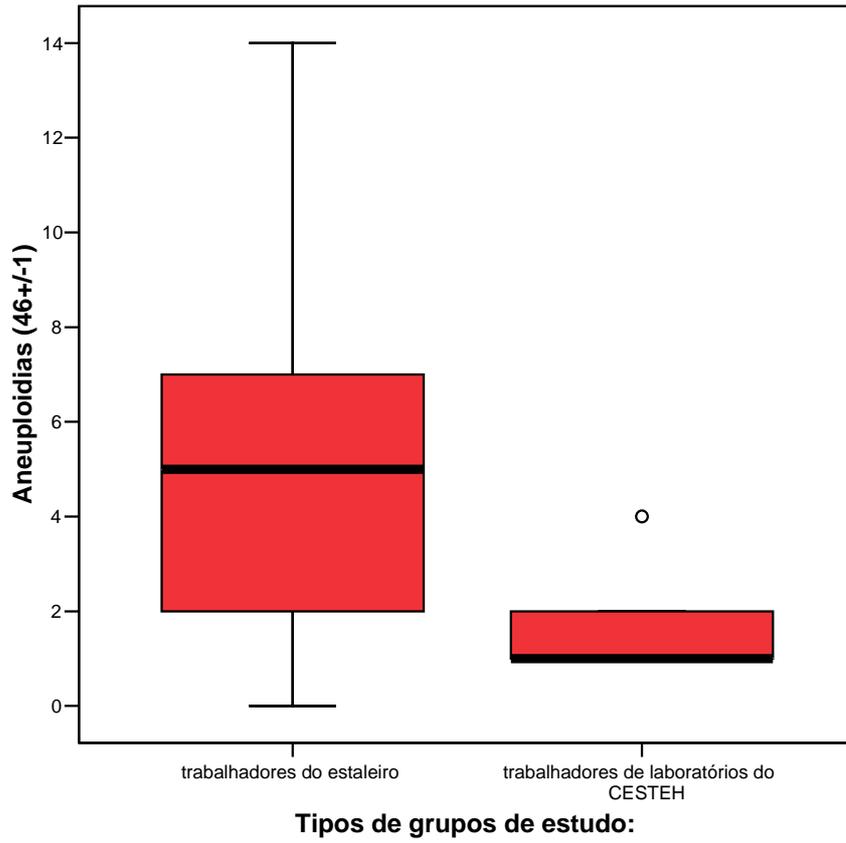
***p<0,001

*** p=0,075

Indicadores Citogenéticos

A possibilidade do uso de indicadores que representem passos intermediários entre a exposição e a doença para estimar o risco ao câncer em populações humanas tem ganhado muita atenção. Esta abordagem oferece vantagens práticas, tais como o pequeno tamanho amostral, baixos custos dos estudos e o potencial de detecção precoce do risco a que uma população exposta pode se encontrar. Na observação de alterações citogenéticas foram analisadas as amostras de 19 trabalhadores sendo 13 do grupo do Estaleiro e 6 do grupo do Laboratório. As alterações observadas foram aneuploidias, separação prematura centromérica (SPC) e aberrações cromossomiais (AC) como anel, quebras, união de cromátides irmãs. Estas alterações podem ser observadas na Tabela 5. Foi excluído da amostra do Laboratório, para avaliar diferenças entre os grupos, um indivíduo que apresentou resultados dos indicadores citogenéticos muito discrepantes do conjunto do grupo (aneuploidia= 25, SPC=5, AC=1). Apesar deste trabalhador não fazer uso de medicamentos anti-neoplásicos, reportou fazer uso de diversos medicamentos de estimulação imunológica.

Nos trabalhadores do Estaleiro, a média de aneuploidias encontradas foi de 5,7, de SPCs de 3,5, e de aberrações cromossomiais de 0,46. Os trabalhadores do Laboratório apresentaram média de 1,8 aneuploidias, de 0,4 SPCs, e de 0,20 aberrações cromossomiais. Estes dados representam frequências de 16,7% de aneuploidias, 6,7% de SPCs e 1,1% de ACs no grupo estaleiro. No grupo Laboratório, as frequências foram 9% de aneuploidias, 2% SPCs e 1% de ACs, ressaltando a exclusão de um indivíduo. O conjunto de três gráficos Box-plot da Figura 4, e as ilustrações A e B da Figura 5 apresentam a distribuição das alterações citogenéticas nos dois grupos e as diferenças das alterações encontradas.



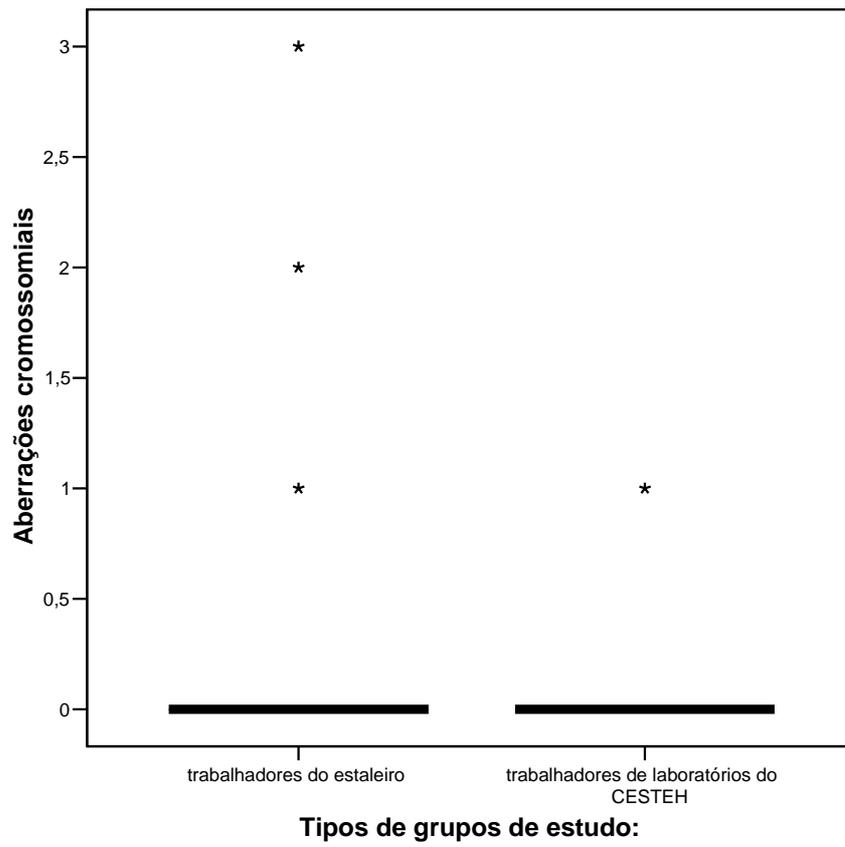
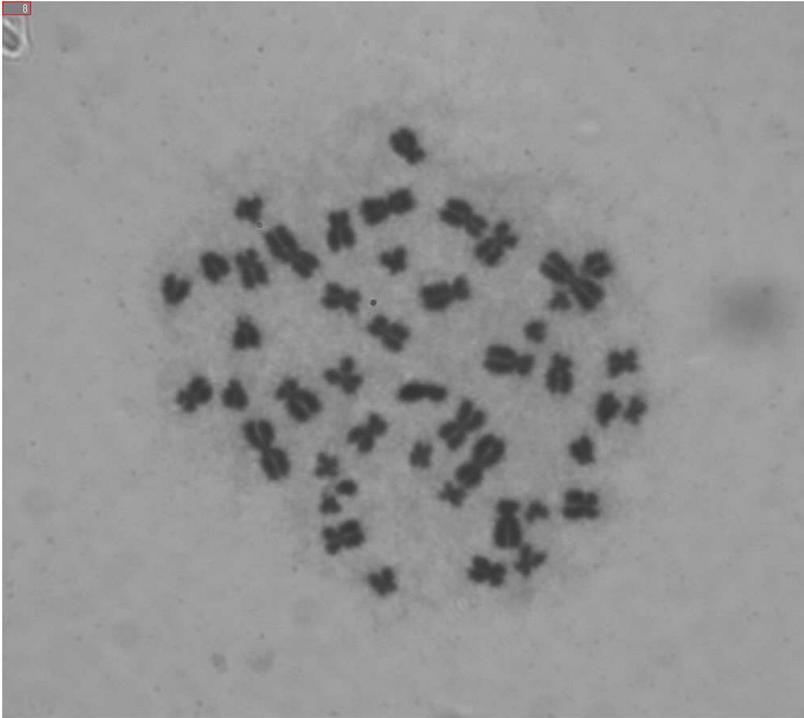


Figura 4 Gráficos Box-Plot demonstrando a distribuição das alterações citogenéticas nos dois grupos. Os gráficos referem-se respectivamente ao número de aneuploidias, SPCs e ACs respectivamente.

A



B

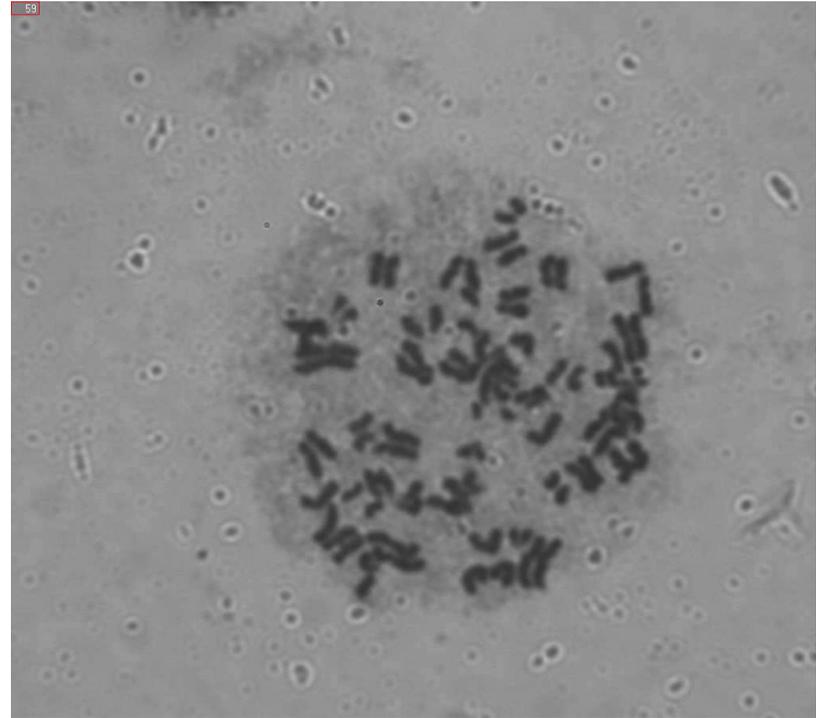


Figura 5 Imagem A-Metáfase normal(46 cromossomos), Imagem B-Metáfase com SPCs de forma generalizada

Foi encontrada diferença significativa entre os grupos para aneuploidias. Esta alteração citogenética, em contraposição com os tecidos normais, pode ser observada em quase todos os tipos de câncer. Vários estudos indicam que a instabilidade cromossômica, que pode indicar falhas na separação mitótica, é a causa principal da aneuploidia. Em células normais, vários sistemas corrigem os acoplamentos anômalos entre os cinetócoros e o fuso mitótico. As falhas nestes sistemas podem dar lugar a cromossomos tardios, e se estes perduram até o final da mitose produzem estruturas chamadas micronúcleos (MNs)³. O micronúcleo se constitui em uma pequena massa nuclear delimitada por membrana e separada do núcleo principal. Os MNs são formados durante a telófase da mitose, quando o envelope nuclear é reconstituído ao redor dos cromossomos das células filhas. São resultantes de fragmentos cromossômicos acêntricos ou de cromossomos inteiros que não foram incluídos no núcleo principal. Assim sendo, os MNs representam perda de cromatina em consequência de dano cromossômico estrutural (fragmento) ou dano no aparelho mitótico³⁰. Major, Jakab e Tompa¹², encontraram frequências de aneuploidias nos controles de 6,7%. O presente estudo encontrou 16,7% no grupo Estaleiro. A idéia de associação causal entre ACs (numéricas e estruturais) e risco para câncer é baseada no conceito que danos genéticos em linfócitos de sangue periférico refletem danos similares em células envolvidas nos processos carcinogênicos³¹. Portanto, a alta frequência de aneuploidias no grupo Estaleiro indica a possibilidade de desenvolvimento de processos de carcinogenicidade.

Major, Jakab e Tompa¹² sugerem que as SPCs podem ser desenvolvidas como um novo indicador citogenético relacionado a exposição principalmente em avaliações do risco de câncer ocupacional, sendo sua utilização mais adequada para este tipo de análise. Sugerem ainda, a condução de investigações epidemiológicas de

estudos prospectivos e citogenéticos da relação das SPCs com a exposição a substâncias químicas utilizadas nos ambientes de trabalho. Neste estudo, foi encontrada diferença entre os grupos embora não significativa. Possivelmente, o número de indivíduos avaliados no grupo Laboratório não foi suficiente para discriminar a diferença significativa entre os grupos. O mesmo pode ter ocorrido com relação as ACs . No grupo Estaleiros, foram avaliadas 808 metáfases, com total de 630 válidas e encontradas alterações como anéis (2), quebras cromatídica (1) e cromossômica (1). No grupo Laboratório, foram analisadas 168 metáfases, com total de 100 válidas, somente sendo encontrada uma quebra cromatídica. Ainda com relação as SPCs, um trabalhador do grupo Estaleiro apresentou valor discrepante se comparado a média do grupo. Este indivíduo já apresenta distúrbios hematológicos importantes como leucopenia e valores elevados da célula bastão e deve ter acompanhamento clínico mais rigoroso.

Santos, Ferrari and Luna¹⁰ avaliaram através de monitoramento citogenético, indivíduos ocupacionalmente expostos a substâncias químicas e biológicas que exerciam atividades laboratoriais na Universidade de Brasília. Foram analisados 43 expostos e 29 não expostos que eram trabalhadores de setores administrativos. Não foi encontrada diferença significativa entre os grupos para a maioria das aberrações. Somente um sub-grupo constituído de trabalhadores de um laboratório de genética, apresentou aumento da frequência da AC cromatídica do tipo gap Estes trabalhadores usavam ácido hidrolórico, metanol, brometo de etídeo, xilol, clorofórmio, ácido acético e álcool isopropílico. No grupo Laboratório do presente estudo, as substâncias utilizadas com maior frequência foram: metanol, hexano, acetonitrila, ácido acético e etanol. Estas substâncias quando utilizadas produzem um complexo de misturas. Embora os resultados do estudo citado assim como os resultados do presente estudo

não tenham demonstrado fortes evidências da relação alterações citogenéticas versus exposição, é importante ressaltar a necessidade de um programa de prevenção da exposição profissional e um controle efetivo dos aspectos ambientais.

Tabela 5: Indicadores Citogenéticos Valores Médios, Mínimos e Máximos.

| Tipos de grupos de estudo: | | Aneuploidias (46+/-1) | SPC | AC |
|--|---------------|------------------------------|------------|-----------|
| Trabalhadores do estaleiro | Média | 5,7*** | 3,5 | 0,46 |
| | Desvio Padrão | 4,05 | 6,5 | 0,97 |
| | Mínimo | 0 | 0 | 0 |
| | Máximo | 14 | 24 | 3 |
| | n | 13 | 13 | 13 |
| Trabalhadores de laboratórios do CESTEJ | Média | 1,8*** | 0,40 | 0,20 |
| | Desvio Padrão | 1,3 | 0,55 | 0,52 |
| | Mínimo | 1 | 0 | 0 |
| | Máximo | 4 | 1 | 1 |
| | n | 5 | 5 | 5 |
| Total | Média | 4,6 | 2,6 | 0,39 |
| | Desvio Padrão | 3,9 | 5,6 | 0,85 |
| | Mínimo | 0 | 0 | 0 |
| | Máximo | 14 | 24 | 3 |
| | n | 18 | 19 | 19 |

*** diferença significativa entre os grupos, $p=0,007$

Os mecanismos de mutagênese e carcinogênese parecem estar intimamente ligados. A mutação é uma consequência do dano no DNA e este pode ser o estágio inicial no processo pelo qual a maioria das substâncias carcinogênicas inicia a formação do tumor. Os primeiros eventos no processo da carcinogênese química

incluem a exposição à substância, seu transporte a célula alvo, sua ativação a metabólitos ativos, e o dano no DNA, levando a mudança que resulta em uma célula iniciada³⁰. Com o objetivo de associar os achados citogenéticos, foram realizadas correlações entre estes indicadores. Foram encontradas correlações positivas e significativas entre aneuploidias e SPCs ($p=0,042$ $r=0,470$), bem como entre aneuploidias e ACs ($p=0,042$, $r=0,471$), como observado na Figura 5. Por problemas no processo de divisão celular os cromossomos replicados podem não se separar corretamente das células filhas. Isto pode resultar em células que possuam um número demasiado de cromossomos, ou reduzido. Um exemplo bem comum não relacionado ao câncer é a Síndrome de Down, onde existe uma cópia extra do cromossomo 21 em todas as células do indivíduo afetado. As células cancerosas são em sua maioria células com aneuploidia. As células humanas normalmente têm 46 cromossomos em cada, mas as células cancerosas, na grande maioria das vezes, possuem mais do que 100. A presença destes cromossomos extras faz com que as células sejam instáveis causando transtornos severos no controle da divisão celular. Portanto, está claro que a aneuploidia é uma característica comum das células cancerosas³ Neste estudo, a aneuploidia se correlacionou fortemente com as outras alterações citogenéticas demonstrando ser importante ferramenta na avaliação da genotoxicidade.

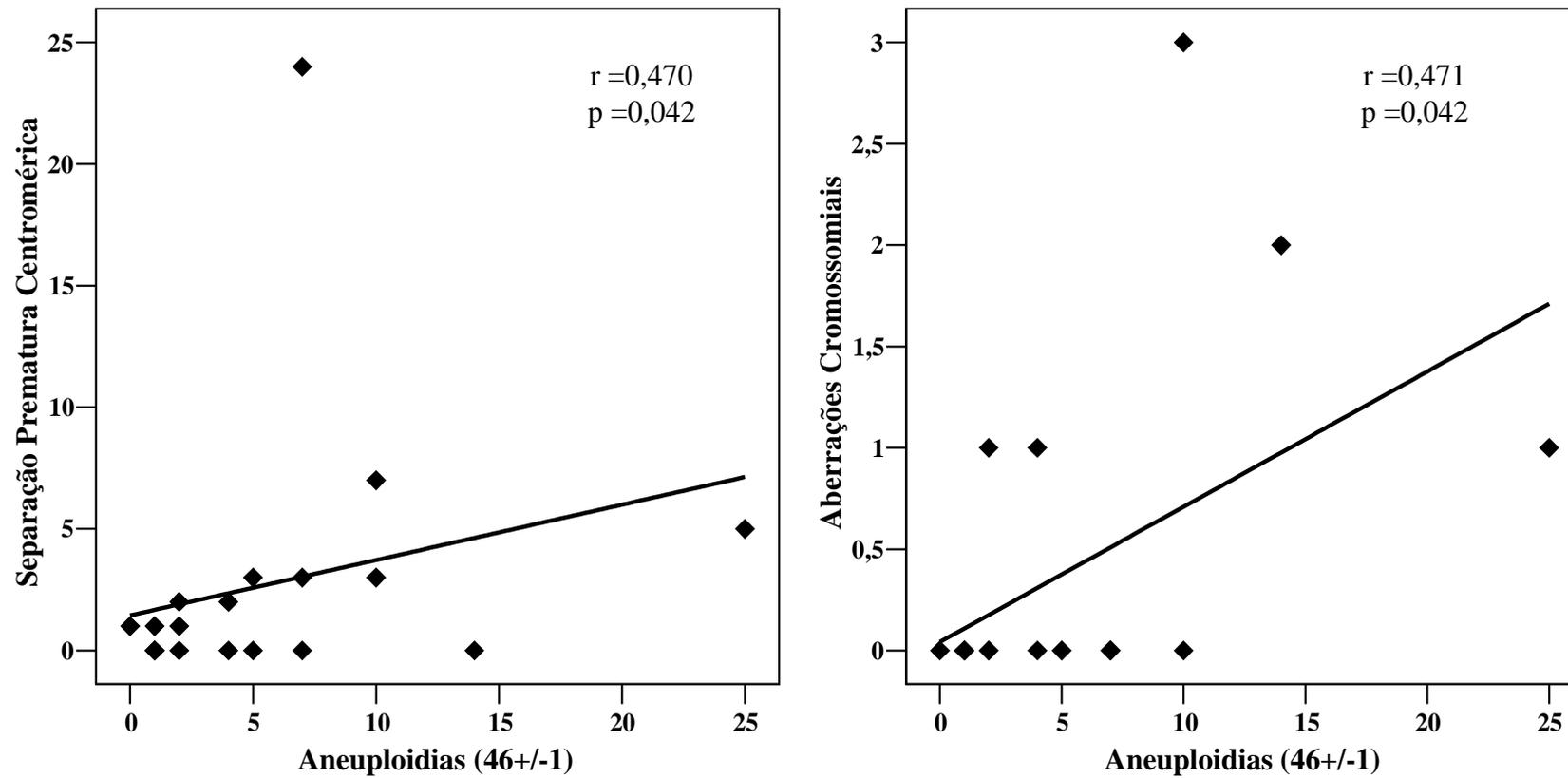


Figura 6 Correlações significativas entre os indicadores citogenéticos, aneuploidia x SPC e aneuploidia xAC respectivamente (n=19; média aneuploidia =5,7 +/- 6,0; média SPCs=2,74 +/-5,5; média AC= .42 +/-0,84)

Foi encontrada uma forte correlação significativa ($r=0,632$, $p= 0,027$) entre SPC e o indicador de efeito ao chumbo, % de recuperação da ALA-D. Estudos de mortalidade por câncer em humanos, tentando correlacionar exposição crônica a chumbo e ocorrência de câncer, têm mostrado um moderado poder de predição específicas do risco relacionado ao metal, devido às populações expostas sofrerem diversas outras exposições sobrepostas a carcinógenos, como arsênio, cromo hexavalente, cádmio, além dos hidrocarbonetos aromáticos e tabagismo. Em função dos resultados obtidos com estudos em animais de experimentação, que demonstram que sob altas concentrações os compostos de chumbo inorgânico são carcinogênicos principalmente para o rim, o IARC classifica o chumbo elementar e os compostos inorgânicos no grupo 1B (provável carcinógeno para humanos porque possui limitadas evidências em animais e humanos)²³ trabalhadores do Estaleiro apresentam exposição ocupacional ao chumbo. A correlação entre Pb-S e % rec de ALAD, junto com % rec de ALAD e SPCs, neste grupo, é uma evidência da relação desta exposição com o aparecimento desta alteração citogenética.

Com o objetivo de verificar se as alterações citogenéticas encontradas neste estudo tinham comportamento discrepante frente a uma população considerada normal (descrita em literatura) foi realizado o teste chi-quadrado para uma única variável. Este teste focaliza quaisquer discrepâncias entre frequências observadas e esperadas de uma variável determinada. A questão crucial corresponde ao fato de as discrepâncias entre estas frequências serem suficientemente grandes, ou seja, apresentarem um valor χ^2 alto, para serem qualificadas como um resultado raro. Um valor de χ^2 alto é aquele que supera o valor de χ^2 crítico específico do nível de significância para o grau de liberdade da análise. Para esta comparação foi selecionado o estudo conduzido por Major, Jakab e Tomba¹², pois neste estudo eram

avaliados os três tipos de alterações citogenéticas também encontradas no presente estudo.

Tabela 6: Frequências das alterações citogenéticas esperadas e observadas no grupo Estaleiro e em todos os indivíduos em linfócitos

| Grupo | Frequência Observada | Proporção de referência | Frequência esperada | χ^2 |
|-------------------|----------------------|-------------------------|---------------------|-----------|
| Estaleiro s/Aneup | 525 | 9423 | 587,8 | 100,01*** |
| c/Aneup | 105 | 677 | 42,2 | |
| Total | 630 | 10100 | 630 | |
| Todos s/Aneup | 591 | 9423 | 681,1 | 177,7*** |
| c/Aneup | 139 | 677 | 48,9 | |
| Total | 730 | 10100 | 730 | |
| Estaleiro s/SPC | 588 | 10029 | 625,6 | 321,0*** |
| c/SPC | 42 | 71 | 4,4 | |
| Total | 630 | 10100 | 630 | |
| Todos s/SPC | 681 | 10029 | 724,9 | 377,66*** |
| c/SPC | 49 | 71 | 5,1 | |
| Total | 730 | 10100 | 730 | |
| Estaleiro s/AC | 623 | 10061 | 627,6 | 8,61** |
| c/AC | 7 | 39 | 2,4 | |
| Total | 630 | 10100 | 630 | |
| Todos s/AC | 721 | 10061 | 727,2 | 13,61** |
| c/AC | 9 | 39 | 2,8 | |
| Total | 730 | 10100 | 730 | |

p<0,01 χ^2 crítico= 6,64 *p<0,001 χ^2 crítico= 10,83

A Tabela 4 apresenta os resultados encontrados nesta análise. Os dados foram analisados pelo número de células avaliadas nos dois estudos e foram conduzidos no grupo Estaleiro (n=13) e com todos os indivíduos (n=19). Os valores do χ^2 encontrados para Aneuploidia, SPC no grupo Estaleiro foram 100,0 e 321,0 ($p<0,001$), respectivamente. Para todos os indivíduos estas alterações apresentaram os seguintes valores 177,7 e 377,66 ($p<0,001$), respectivamente. Com relação a ACs, os valores encontrados foram para o grupo Estaleiro $\chi^2 = 8,61$ e para todos os indivíduos $\chi^2 = 13,61$ ($p<0,01$). Estes resultados revelam que os trabalhadores avaliados neste estudo apresentam alterações citogenéticas diferentes do controle do estudo escolhido, demonstrando que estão expostos ocupacionalmente a substâncias clastogênicas, em especial o grupo Estaleiro. No estudo de Major, Jakab & Tompa¹², foi encontrada diferença significativas entre os diferentes grupos de exposição ocupacional e o controle. O controle escolhido neste estudo era formado de indivíduos que moravam longe de área de indústrias químicas e não exerciam atividades relacionadas nas mesmas. Os grupos ocupacionalmente expostos foram trabalhadores de diversas indústrias químicas (petroquímica, química e farmacêutica) bem como de enfermeiras expostas em hospitais a várias substâncias genotóxicas.

O monitoramento dos efeitos genotóxicos de carcinógenos em populações expostas está aumentando sua aplicação na etapa de Identificação do Perigo ou em propostas de Avaliação do Risco. Esta nova abordagem deve ser realizada em conjunto com outras informações dando um caráter multidisciplinar a esta análise. A relação da genotoxicidade com a carcinogenicidade é de fato muito importante, entretanto o monitoramento genotóxico humano é também essencial como ferramenta biológica na avaliação de toxicidade de exposição á substâncias químicas.

CONCLUSÕES

- ✓ Na análise dos indicadores biológicos de exposição a metais, o grupo Estaleiro apresenta exposição ocupacional ao chumbo. As diferenças significativas entre os grupos estudados quanto aos indicadores ALA-U, Pb-S, a correlação significativa entre % de recuperação da ALAD e Pb-S neste grupo, e 22,2% destes trabalhadores que apresentaram % de recuperação da ALAD acima do Índice Biológico Máximo demonstram esta exposição.
- ✓ Uma avaliação mais precisa deve ser conduzida para se assegurar que o grupo Estaleiro seja considerado ocupacionalmente exposto ao manganês. A alta incidência de pneumonia neste grupo e os valores encontrados de Mn-S sugerem que a exposição a este metal possa ser uma das causas destes achados.
- ✓ A alta frequência de aneuploidias no grupo Estaleiro indica risco de desenvolvimento de processos de carcinogênese.
- ✓ Um trabalhador do grupo Estaleiro apresentou valor discrepante com relação as SPCs, se comparado a média do grupo. Este indivíduo já apresenta distúrbios hematológicos importantes como leucopenia e valores elevados da célula bastão e deve ter acompanhamento clínico mais rigoroso.
- ✓ O grupo Laboratório não apresentou fortes evidências de alterações citogenéticas com relação a exposição a substâncias químicas. Entretanto, é importante ressaltar a necessidade de um programa de prevenção da exposição profissional e um controle efetivo dos aspectos ambientais.
- ✓ A aneuploidia se correlacionou fortemente com as outras alterações citogenéticas demonstrando ser importante ferramenta na avaliação da genotoxicidade.

- ✓ Existe uma evidência da relação da exposição ao metal chumbo com o aparecimento da alteração citogenética SPC no grupo Estaleiro, pois foram encontradas fortes associações entre estes indicadores biológicos.
- ✓ Os resultados dos testes χ^2 revelam que os trabalhadores avaliados neste estudo apresentam alterações citogenéticas diferentes do controle do estudo de Major, Jakab e Tompa, 1999, demonstrando que estão expostos ocupacionalmente a substâncias clastogênicas, em especial o grupo Estaleiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1 - ALBERTINI, R.J.; ANDERSON, D.; DOUGLAS, G.R.; HAGMAR, L.; HEMMINK, K.; MERLO, F. et al. (2000). IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *Mutational Research*. 463: 111-172.

2 - RABELLO-GAY, M.N. ; RODRIGUES, M.A.R. ; MONTELEONE NETO, R. (1991). Mutagênese, carcinogênese e teratogênese: métodos críticos de avaliação. *75*: 97-103.

3 - Site Cancerquest.com www.cancerquest.com

4 - HAGMAR, LARS; STROMBERG, U.; TINNENBERG, H. ; MIKOCZY, Z. (2001). The usefulness of cytogenetic biomarkers as intermediate endpoints in carcinogenesis. *Int. J. Hyg. Environ. Health*. 204: 43-47.

5 - CLAYSON D.B; IVERSON, F; NERA EA; LOK E. (1991). Early indicators of potential neoplasia produced in the rat forestomach by non-genotoxic agents: the importance of induced cellular proliferation. *Mutat Res*. 248(2): 321-31.

6 - CELIK, A.; AKBAS, E. (2005). Evaluation of sister chromatid exchange and chromosomal aberration frequencies in peripheral blood lymphocytes of gasoline station attendants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 60: 106-112.

7 - CARRANO, A.V.; NATARAJAN, A T., (1987). Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques, International commission for protection against environmental mutagens and carcinogens no 14.

8 - OBE, G.; PFEIFFER, P.; SAVAGE, J.R.K.; JOHANNES, C.; GOEDECKE, W.; JEPPESEN, P.; NATARAJAN, A.T.; LÓPEZ, W.; FOLLE, G.A.; DRETS, M.E., (2002). Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution. *Mutation research*. 504: 17-36.

9 - ROSSNER, P. ; BOFFETTA , P.; CEPPI, M. ; BONASSI, S. ; SMERHOVSKY, Z. ; LANDA, K. ; JUZOVA, D. ; SRAM, R.J. (2005). Chromosomal aberrations in lymphocytes of healthy subjects and risk of cancer. *Environmental Health Perspectives*. 113(5): 517-520.

10 - ALMEIDA SANTOS, M.F.M; FERRARI, I; LUNA, H. (2005). Chromosomal aberration analysis in workers exposed to chemical and biological hazards in research laboratories. *Environmental Research*. 97: 330-334.

11 - INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY (IAEG), (1986). Biological Dosimetry: chromosomal aberration analysis for dose assessment. pp 9-12.

12 - MAJOR, J.; JAKAB, M.G. E TOMPA, A. (1999). The frequency of induced premature centromere division in human populations occupationally exposed to genotoxic chemicals. *Mutation Research*. 445: 241-249.

13 - INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC), (1996). Printing processes and inks, carbon black and some nitro compounds. *Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*. Vol. 65.

14 - GREENBERG, M.; HAMILTON, R.J.; PHILLIPS, S.D., (1997). *Occupational, Industrial, and Environmental Toxicology*. 1ª Edição. ED. Mosby. pp. 211-217.

15 - GOODMAN, L; GILMAN, A.G. GILMAN, A. (2003). As bases farmacológicas da terapêuticas, 9ª edição. Ed. Guanabara koogan S. A; Rio de Janeiro.

16 - PELCLOVA D, CERNA M, PASTORKOVA A, VIBIKOVA V, PROCHAZKA B, HURYCHOVA D, DLASKOVA Z, HORNVCHOVA M. (2000). Study of the genotoxicity of toluene. Arch Environ Health. Jul-Aug; 55(4): 268-73.

17 – GAIKWAD, N. W. AND BODELL, W. J. (2002). Formation of DNA adducts in HL-60 cells treated with the toluene metabolite *p*-cresol: a potential biomarker for toluene exposure.

18 - HOLECKOVA, B.; PIESOVA, E.; SIVIKOVA, K.; DIANOVSKY, J. (2004). Chromosomal aberrations in humans induced by benzene. Ann Agric Environ Méd. 11: 175-179.

19- ROMIEU, I., LACASANA, M., McCONNELL R. (1997). Lead Exposure in Latin America and the Caribbean. Environ. Health Perspect. 105 (4): 398-405.

20 - TONG, S., SCHIRNDING, Y. E., PRAPAMONTOL, T. (2000). Bulletin of the World Health Organization. 78 (9): 1068-1077.

21 - MATTOS, R.C.O.C. (2001). Estratégias para avaliação da exposição ao chumbo: estudos comparativos dos indicadores biológicos e efeitos relacionados. Tese de doutorado em Biologia Celular e Molecular. Instituto Oswaldo Cruz/Fundação Oswaldo Cruz.

22 - LAUWERYS, R. R. (1991). Occupational Toxicology. In: Casarett and Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons (M. O. Amdur, J. Doull & C. D. Klaassen, orgs). Pergamon Press. USA. 947-969.

23 - AZEVEDO, F. A. AND CHASIN, A. A. (2003). Metais Gerenciamento da Toxicidade, 1ª edição. Ed. Atheneu Inter Tox. São Paulo. pp. 67-97.

24 – SAKAI, T; YANAGIHARA, S AND USHIO, K. (1980). Restoration of lead inhibited 5-aminolevulinatase activity in whole blood by heat, zinc ion and (or) dithiothreitol. *Clinical Chemistry*. 26: 625-628.

25 - OGATA, M.; TAGUCHI, T. (1987). HPLC procedure for quantitative determination of urinary delta-aminolevulinic acid as indices of lead exposure. *International Archives of Occupational and Environ Health*. 59: 385-391.

26 - RAMIREZ, H. (2006). Correlação entre a exposição ao chumbo e a atividade da enzima ácido delta-aminolevulínico desidratase (ALA-D), paratomônio (PTH) e fatores nutricionais em crianças. Dissertação de Mestrado submetido à Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca (ENSP), Rio de Janeiro. Fundação Oswaldo Cruz.

27 - AHAMED, M.; VERMA, S.; KUMAR, A. AND SIDDIQUI, M.K.J. (2005). Environmental Exposure to lead and its correlation with biochemical indices in children. *Science of the Total Environmental*. 346: 48-55.

28 – APOSTOLI, P.; LUCCHINI, R. AND ALESSIO, L. (2000). Are current biomarkers suitable for the assessment of manganese exposure in individual workers? *Am J Ind Med*. 37: 283-290.

29 – BIOLIND: www.biolind.net

30 - RIBEIRO, I. R; SALVADORI, D. M; MARQUES, E., 2003. Mutagêse Ambiental, 1ª edição. Ed. Ulbra; Rio Grande do Sul.

31-BONASSI, S.; HAGMAR, L.; STRÖMBERGET, U.; MONTAGUD, A.H.; TINNENBRGAL, H., FORNI, A. et al (2000). Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer independently of exposure to carcinogens. *Cancer Research*. 60: 1619-1625.

ANEXO 1



Questionário de Avaliação de Exposição a Substâncias Químicas

1- Número: _____

2-CESTEH número: _____

A) Dados gerais

1. Data de hoje: ___/___/___ Hora do início: _____
2. Nome do voluntário _____
3. Endereço: _____
4. CEP: _____ -9-Faltando
5. Telefone de contato: _____ -9-Faltando
6. Sexo : 1 - M 2 - F
7. Estado Civil :
1- Casado 2- Solteiro 3- União Livre 4- Separado 5- Viúvo
8. Data de nascimento: ___/___/___
9. Idade: _____anos
10. Você sabe ler e escrever? 1- sim 2- não (ir para pergunta 12) 9- Faltando
11. Até que ano você estudou na escola?
1- ensino fundamental completo 2- ensino fundamental incompleto
3- ensino médio completo 4- ensino médio incompleto
5- mais que o ensino médio. Cite: _____
9- Faltando
12. Quantas pessoas moram permanentemente em sua residência?
1- uma 2- duas 3- três 4- quatro 5- mais de quatro
13. Quantos cômodos (quartos e salas) têm a sua casa ?
1- um 2- dois 3- três 4- quatro 5- mais de quatro
14. Há quanto tempo você mora nesta casa? _____ anos e _____meses 9-Faltando
15. Como é o piso da sua casa?
1- “vermelhão” 2- cimento 3- madeira (taco)

- 4- cerâmica 5- outros. Especifique: _____ 9- Faltando
16. Quando sua casa foi pintada pela última vez ? ____ anos ____ meses
- 1- nunca foi pintada (ir para pergunta 20) 9- Faltando
17. Na ocasião da pintura foi usada lixa para o preparo das paredes?
- 1- sim 2- não 9- Faltando
18. A sua casa possui água encanada?
- 1- sim 2- não (pular para a pergunta 20) 9- Faltando
19. Os encanamentos da sua casa são de:
- 1- plástico 2- metal 3- outros. Especifique: _____ 9- Faltando
20. Qual o destino do lixo da sua casa?
- 1- recolhido pelo lixeiro 2- colocado na caçamba 3- enterrado 4- queimado
- 5- deixado a céu aberto 6- outros. Especifique: _____ 9- Faltando
21. Existe próximo a sua residência:
- | | |
|--------------------------------------|---|
| 1- Indústria de produtos de borracha | 10- Soldagem |
| 2- Indústria de plásticos | 11- Fábrica de bateria ou recarregadores |
| 3- Indústria de cerâmica | 12- Incineração de Lixo |
| 4- Gráfica | 13- Atividade de contato com gasolina |
| 5- Fábrica de tintas | 14- Pintura de carros e eletrodomésticos |
| 6- Construção ou renovação de casas | 15- Refinaria |
| 7- Jateamento de areia | 16- Lavoura (horta/pomar) |
| 8- Atividade de derreter metais | 17- Outros. Especifique: _____ |
| 9- Concerto de radiadores | 18- Não existe nenhuma atividade acima descrita |
22. Você morou em algum lugar que fosse próximo a:
- | | |
|--------------------------------------|---|
| 1- Indústria de produtos de borracha | 10- Soldagem |
| 2- Indústria de plásticos | 11- Fábrica de bateria ou recarregadores |
| 3- Indústria de cerâmica | 12- Incineração de Lixo |
| 4- Gráfica | 13- Atividade de contato com gasolina |
| 5- Fábrica de tintas | 14- Pintura de carros e eletrodomésticos |
| 6- Construção ou renovação de casas | 15- Refinaria |
| 7- Jateamento de areia | 16- Lavoura (horta/pomar) |
| 8- Atividade de derreter metais | 17- Outros. Especifique: _____ |
| 9- Concerto de radiadores | 18- Não existe nenhuma atividade acima descrita |

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

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

B) Dados sobre o trabalho

25. Qual é o seu cargo no trabalho?

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

27. Há quanto tempo trabalha neste cargo? ____anos ____meses 9- Faltando

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

29. Você usa equipamentos de proteção individual?

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

30. Quais?

1- Luvas

5- Avental

2- Máscara

6- Bota

3- Protetor auricular

7- Capacete

4- Óculos

8- Outros. Especifique: _____

31. Com que frequência você usa luvas?

1- sempre 2- frequentemente 3- raramente

32. Com que frequência você usa máscara?

1- sempre 2- frequentemente 3- raramente

33. Com que frequência você usa protetor auricular?

1- sempre 2- frequentemente 3- raramente

34. Com que frequência você usa óculos?

1- sempre 2- frequentemente 3- raramente

35. Com que frequência você usa avental?

1- sempre 2- frequentemente 3- raramente

36. Com que frequência você usa bota?

1- sempre 2- frequentemente 3- raramente

37. Com que frequência você usa capacete?

- 1- sempre 2- frequentemente 3- raramente

38. Você fez exame médico admissional?

- 1- sim 2- não

39. Você faz exames médicos periódicos?

- 1- sim 2- não

40. Com qual frequência você faz exames periódicos?

- 1- semestral 2- anual 3- maior periodicidade _____

41. Você já foi afastado por motivo de doença?

- 1- sim 2- não

42. Qual doença? _____

43. Você já trabalhou em:

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

44. Você já trabalhou em outro estaleiro?

1- sim 2- não (ir para pergunta 43)

45. Qual era o cargo que você exercia? _____

D) Hábitos

46. Você fuma?

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

47. Quantos cigarros você fuma por dia? ____ cigarros/dia _____ maços 9- Faltando

48. Há quanto tempo você fuma? ____ anos completos 9- Faltando (ir para pergunta 39)

49. Você já fumou?

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

50. Você parou de fumar há quanto tempo? _____anos _____meses

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

52. Com que frequência você toma bebidas alcoólicas?

1- 4 ou mais vezes por semana 2- até 3 vezes por semana 2- até 2 vezes por semana

3- 1 vez por mês 4- parei de beber 5- não sabe 9- Faltando

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

1- não sabe 8- não se aplica 9- Faltando

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

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

1- pinturas em geral 2- conserto em carros 3- outros. Especifique: _____

9- faltando

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

1- sim 2- não

56. Você já faz radioterapia?

1- sim 2- não

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

1- sim 2- não

ANEXO 2

Termo de Consentimento

De acordo com as Normas da Resolução nº 196, do Conselho Nacional de Saúde de 10 de outubro de 1996

Título da Pesquisa: " Estudo do Impacto da Exposição a Substâncias Químicas como Estratégia de Investigação do Potencial Genotóxico e Neurotóxico”

Coordenadora da Pesquisa: Dr^a Rita de Cássia Oliveira da Costa Mattos

Instituições participantes da pesquisa

- Centro de Estudo da Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana - Escola Nacional de Saúde Pública - Fundação Oswaldo Cruz

O Centro de Estudos da Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana - CESTEHE, é um centro da Escola Nacional de Saúde Pública - ENSP, da Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, do Ministério da Saúde , que tem por objetivos realizar pesquisas, atividades de ensino e criar tecnologias, na área da Saúde Pública.

Como voluntário, o(a) Sr. (Sra.) está sendo solicitado(a) a participar de uma pesquisa, patrocinada pelo CESTEHE/FIOCRUZ. O estudo prevê a participação de trabalhadores do setor de pintura da FIOCRUZ e da indústria naval do Estaleiro BRASFELS em Angra dos Reis, nas áreas com risco de exposição ao chumbo e solventes, através da assinatura do termo de consentimento, de acordo com o item IV.3 da Resolução 196/96.

O (A) Sr.(Sra.) não é obrigado a participar da pesquisa, e poderá se afastar dela a qualquer tempo, sem qualquer prejuízo de sua relação com o pesquisador ou com a instituição. Todas as informações pessoais serão sigilosas, os resultados de suas análises serão fornecidos unicamente ao Sr.(Sra.), e sua identidade não será revelada em qualquer publicação resultante deste estudo. Os exames e procedimentos aplicados serão gratuitos. **Antes de assinar este termo, o(a) Sr.(Sra.) deve entender as informações sobre a pesquisa e fazer todas as perguntas que achar necessário.**

O problema de saúde investigado são as exposições do homem a metais e solventes, causadas por diferentes vias de exposição decorrentes de suas atividades de trabalho, que podem poluir o ar, o solo e a água.. Estes agentes químicos estão presentes nas tintas, e por serem tóxicos uma quantidade alta no ambiente pode causar problemas graves para a saúde das pessoas em geral.

Mutações são transformações biológicas que nossas células sofrem e podem causar mudanças em alguns processos ou atividades vitais. Estas mudanças podem causar o aparecimento de tumores que podem ser espontâneos isto é, aparecem sem a interferência do homem, mas podem ter sua quantidade aumentada com o contato com vários agentes químicos como solventes das tintas, mostrando uma reação tóxica. Outra reação tóxica a estes agentes são efeitos na capacidade de ouvir que podem ser também causados por muito ruído... A avaliação do risco para o aparecimento destas reações tóxicas é o objetivo deste estudo.

Este projeto será realizado durante 2 anos e será feita coleta de sangue e de urina. Caso os seus resultados estejam acima dos valores normais, serão necessários novos exames para confirmação dos resultados. O sangue será coletado com tubos de vidro e agulhas descartáveis, num total de 10 ml (aproximadamente uma colher de sopa). A urina será coletada em frascos plásticos de 30 mL (aproximadamente uma xícara de café), não sendo necessário desprezar o primeiro jato e nem a primeira urina da manhã.. O sangue e urina coletados serão usados exclusivamente para este estudo e, após análise, serão descartados.

Os exames feitos neste estudo podem indicar se as pessoas estão expostas a metais e a solventes. Aquelas que confirmarem os níveis fora dos limites serão encaminhadas para consulta médica no CESTEJ e para a rede do SUS (Sistema Único de Saúde), quando necessário. O acompanhamento clínico destas pessoas será realizado por um médico com experiência no tratamento de indivíduos expostos, que indicará o tratamento mais adequado para cada caso específico.

Você receberá uma cópia deste termo, onde consta o telefone e o endereço do pesquisador principal, podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento.

Murata, MM

Dra. Rita de Cássia Oliveira da Costa Mattos – Coordenadora Pesquisa
Endereço CESTE/ENSP: Rua Leopoldo Bulhões, 1480 – Maginhos
Tel.: 2598-2819 / 2598-2820 / 2598-2981 / 2598-2816
Tel. Comitê de Ética: 2598-2554 ou 2598-2561

Declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios da minha participação na pesquisa e concordo em participar.

Voluntário