

**UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA**



**BIOMARCADORES GENOTÓXICOS E POLIMORFISMOS GENÉTICOS EM
TRABALHADORES EXPOSTOS A FORMALDEÍDO**

Carina Alexandra Fernandes Ladeira

MESTRADO EM BIOLOGIA MOLECULAR HUMANA

2009

**UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA**



**BIOMARCADORES GENOTÓXICOS E POLIMORFISMOS GENÉTICOS EM
TRABALHADORES EXPOSTOS A FORMALDEÍDO**

Carina Alexandra Fernandes Ladeira

MESTRADO EM BIOLOGIA MOLECULAR HUMANA

Dissertação orientada pelo Professor Doutor Manuel Carmo Gomes, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa e Professor Doutor Rui Miguel Brito, Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa, Instituto Politécnico de Lisboa

2009

*“Descobrir como é bom chegar quando se tem paciência.
E para se chegar onde se quer que seja não é preciso dominar a forma, mas a razão.
É preciso antes de mais nada querer. Só não conseguimos quando não tentamos.”*

Amyr Klink

RESUMO

O formaldeído é um agente químico, classificado como carcinogénico em humanos e animais experimentais, amplamente utilizado nos laboratórios de Anatomia Patológica. A exposição a esta substância está epidemiologicamente associada a cancro e a alterações nucleares detectáveis através do teste dos micronúcleos por bloqueio da citocinese. Este método é utilizado extensivamente em epidemiologia molecular, uma vez que permite determinar vários biomarcadores de genotoxicidade, tais como: micronúcleos (biomarcadores de quebra ou perda de cromossomas), pontes nucleoplásmicas (biomarcador de re-arranjo cromossómico, má reparação e/ou fusão de telómeros) e protusões nucleares (biomarcador de eliminação de DNA amplificado e/ou complexos de reparação de DNA).

O objectivo deste trabalho é investigar a relação entre a frequência de alterações nucleares e factores genéticos e ambientais, em indivíduos expostos e não-expostos ocupacionalmente a formaldeído. Para tal, foram constituídos 2 grupos: 56 indivíduos expostos ocupacionalmente a formaldeído (casos) e 85 indivíduos não expostos (controlos). Foram recolhidos sangue periférico e células epiteliais esfoliadas da mucosa bucal. Realizou-se o estudo dos biomarcadores genotóxicos e extracção de DNA para estudo dos polimorfismos nos genes XRCC3 e ADH3.

Os resultados obtidos fornecem evidência inequívoca para associação entre a exposição ocupacional a formaldeído e a presença de alterações nucleares. Os hábitos tabágicos e o consumo de álcool, exercem efeitos significativos na presença de micronúcleos na mucosa bucal, pontes nucleoplásmicas e protusões nucleares. Relativamente aos factores genéticos, verificaram-se associações estatisticamente significativas entre o polimorfismo do gene da ADH3 e a presença de micronúcleos em linfócitos periféricos e do polimorfismo do gene XRCC3 nas protusões nucleares.

Palavras-Chave: Formaldeído, exposição ocupacional, biomarcadores genotóxicos, polimorfismos genéticos, factores ambientais.

ABSTRACT

Formaldehyde is a chemical agent, classified as carcinogenic in humans and experimental animals, widely used in laboratories of Pathology. The exposure to this substance is epidemiologically linked to cancer and nuclear changes detected by the cytokinesis-block micronucleus test. This method is extensively used in molecular epidemiology, since it determines several biomarkers of genotoxicity, such as micronuclei (biomarkers of chromosomes breakage or loss), nucleoplasmic bridges (biomarker of chromosome rearrangement, poor repair and / or telomeres fusion) and nuclear buds (biomarker of elimination of amplified DNA). The aim of this study is to investigate the relationship between the frequency of nuclear changes and genetic and environmental factors in individuals exposed and non-occupationally exposed to formaldehyde. To this end, were made 2 groups: 56 individuals occupationally exposed to formaldehyde (cases) and 85 unexposed individuals (controls). It was collected peripheral blood and exfoliated epithelial cells of oral mucosa and carried out the study of biomarkers of genotoxic and DNA extraction for verification of polymorphisms in XRCC3 and ADH3 genes.

The results provide unequivocal evidence for association between occupational exposure to formaldehyde and the presence of nuclear changes. The smoking and alcohol consumption have significant effects in the presence of micronuclei in oral mucosa, nucleoplasmic bridges and nuclear buds. For genetic factors, there were significant associations between gene polymorphism of ADH3 and the presence of micronuclei in peripheral lymphocytes and gene polymorphism in XRCC3 and nuclear buds.

Keywords: Formaldehyde, occupational exposure, genotoxic biomarkers, genetic polymorphisms, environmental factors.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADH – Álcool desidrogenase
ALDH – Aldeído Desidrogenase
CBMN – Micronúcleos em células bloqueadas na citocinese (*Cytokinesis-Block MicroNucleus*)
CIIT – *Chemical Industry Institute of Toxicology*
ESTeSL – Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa
EPA – *Environmental Protection Agency*
FA – Formaldeído
FISH – *Fluorescent in situ Hybridization*
HUMN – *Human MicroNucleus*
IC – Intervalo de Confiança
IUPAC – *International Union of Pure and Applied Chemistry*
MGG – *May-Grünwald Giemsa*
MN – Micronúcleos (*Micronucleus*)
MNT – Teste dos Micronúcleos (*Micronucleus Test*)
NBUD – Protusões nucleares (*Nuclear Buds*)
NIOSH – *National Institute for Occupational Safety and Health*
NNK – nitrosamina derivada da nicotina (*Nicotine derived Nitrosamino Ketone*)
NPB – Pontes Nucleoplásmicas (*Nucleoplasmic Bridges*)
OR – *Odds Ratio*
OSHA – *Occupational Safety and Health Administration*
PCR – *Polimerase Chain Reaction*
RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism*
SNP – Polimorfismos num único nucleótido (*Single-nucleotide polymorphism*)
SPSS – *Statistical Package for the Social Sciences*
XRCC3 – *X-Ray Cross-Complementation 3*

AGRADECIMENTOS

Para a concretização deste trabalho foi fundamental a colaboração dos meus orientadores aos quais expresso o meu agradecimento.

Ao Professor Doutor Miguel Brito, orientador externo, pela partilha de saber científico, pela sua disponibilidade, esclarecimento de dúvidas e amizade.

Ao Professor Doutor Manuel Carmo Gomes, orientador interno, pela sua disponibilidade no esclarecimento de conceitos, práticas e dúvidas especialmente na área da Estatística.

Para além destes, muitas outras pessoas especiais contribuíram para a materialização deste trabalho, pelo seu apoio constante, incentivo, confiança, disponibilidade, ensinamentos e amizade.

A todos eles agradeço por estarem presentes no meu caminho e terem contribuído para que este fosse mais tranquilo.

3.5.3.2.4. ESTUDO DO POLIMORFISMO XRCC3 T241M POR PCR EM TEMPO REAL.....	15
3.5.3.2.5. ESTUDO DO POLIMORFISMO DA ADH3 ILE349VAL POR PCR-RFLP.....	15
3.5.3.3. CÉLULAS EPITELIAIS.....	16
3.5.4. PROCEDIMENTOS ESTATÍSTICOS.....	17
3.5.5. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS-LEGAIS.....	17
4. RESULTADOS.....	17
5. DISCUSSÃO DE RESULTADOS.....	24
6. CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	27
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28
ANEXOS	

ÍNDICE DE TABELAS

	PÁG.
Tabela 1 – Variáveis em estudo para a verificação de uma possível associação da exposição ocupacional a FA e biomarcadores genotóxicos e polimorfismos genéticos.	12
Tabela 2 – Programa utilizado para a aplicação da técnica de PCR em tempo real para o polimorfismo XRCC3 T241M.	15
Tabela 3 – Programa utilizado para aplicação da técnica de PCR para o polimorfismo da ADH3 Ile349Val.	16
Tabela 4 – Distribuição de características seleccionadas dos participantes do estudo.	18
Tabela 5 – Resultados das alterações nucleares nas amostras de casos e controlos.	18
Tabela 6 – Distribuição genotípica e alélica dos polimorfismos XRCC3 T241M e da ADH3 Ile349Val na amostra do estudo.	19
Tabela 7 – Micronúcleos (MN) em linfócitos periféricos.	20
Tabela 8 – Odds ratio (OR) e Intervalos de Confiança (IC) para os parâmetros significantes no estudo da variável dependente MN em linfócitos periféricos.	21
Tabela 9 – Pontes nucleoplásmicas (NPB) em linfócitos periféricos.	21
Tabela 10 – Odds ratio (OR) e Intervalos de Confiança (IC) para os parâmetros significantes no estudo da variável dependente NPB.	22
Tabela 11 – Protusões nucleares (NBUD) em linfócitos periféricos.	22
Tabela 12 – Odds ratio (OR) e Intervalos de Confiança (IC) para os parâmetros significantes no estudo da variável dependente NBUD.	23
Tabela 13 – Micronúcleos (MN) em células esfoliadas da mucosa bucal.	23
Tabela 14 – Odds ratio (OR) e Intervalos de Confiança (IC) para os parâmetros significantes no estudo da variável dependente MN em células esfoliadas da mucosa bucal.	24

1. INTRODUÇÃO

As alterações progressivas que ocorrem no local de trabalho, no ambiente e nos estilos de vida nas últimas décadas possibilitam a exposição a diferentes substâncias, nomeadamente o formaldeído. O formaldeído é um gás incolor, solúvel na água e que reage rapidamente com o local de contacto. Actualmente está classificado como agente carcinogénico em humanos e animais experimentais, pela *Occupational Safety and Health Administration (OSHA)* e pelo *National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH)*. A Norma Portuguesa 1796 (2004), entretanto, classifica o formaldeído como sensibilizante e agente carcinogénico suspeito no Homem.

Estudos epidemiológicos [1] em trabalhadores de indústrias, embalsamadores, patologistas e anatomistas têm associado a exposição de formaldeído ao elevado risco de diversos tipos de cancro, nomeadamente da cavidade nasal, nasofaringe, pulmão, cérebro, pâncreas, próstata, cólon e sistema linfohematopoiético.

Desta forma, são desejáveis novos instrumentos dotados de maior sensibilidade para pesquisar o risco de cancro provocado por agentes químicos. É neste contexto que surge o método de estudo de micronúcleos em células bloqueadas na citocinese, como uma ferramenta que permite mensurar a instabilidade genómica a nível cromossómico e molecular, nomeadamente a quebra, o re-arranjo e a perda de cromossomas, bem como a não-disjunção, a amplificação de material genético, necrose e apoptose [2]. Este método está inserido no Teste de Micronúcleos, constituindo um instrumento valioso para a biomonitorização e programas de prevenção. No entanto, não se podem descartar alguns aspectos, tais como polimorfismos genéticos que alteram a resposta individual a agentes tóxicos e cancerígenos, bem com outros factores inerentes ao ambiente onde o indivíduo se insere, como os hábitos alimentares e estilos de vida.

1.1. QUESTÃO DE PARTIDA

Qual a relação entre a frequência de alterações nucleares e factores genéticos e ambientais em trabalhadores expostos ocupacionalmente a formaldeído?

1.2. OBJECTIVOS

1.2.1. OBJECTIVO GERAL

Verificar a relação entre a frequência de alterações nucleares – micronúcleos, pontes nucleoplásmicas e protusões nucleares – e factores genéticos e ambientais em trabalhadores expostos ocupacionalmente a formaldeído.

1.2.2. OBJECTIVOS ESPECÍFICOS

1. Relacionar a frequência de alterações nucleares com a exposição ocupacional a formaldeído;
2. Investigar a relação entre a frequência de alterações nucleares com a presença de polimorfismos genéticos que codificam para XRCC3 e ADH3;
3. Investigar a relação entre a frequência de alterações nucleares com estilos de vida, como hábitos tabágicos e consumo de álcool.

2. ESTADO DE ARTE

Abordagens epidemiológicas moleculares são utilizadas frequentemente para identificar etiologias para os problemas de saúde em humanos. O fio condutor deste tipo de abordagens consiste no estabelecimento de associações entre, por um lado, condições e substâncias ambientais potencialmente perigosas e, por outro lado, o risco de desenvolvimento de cancro. Uma vez que a carcinogénese é um processo prolongado, os biomarcadores que têm sido associados a eventos biológicos anormais têm sido desenvolvidos e integrados em estudos epidemiológicos moleculares. Os biomarcadores são determinantes quantificáveis de eventos biológicos que permitem a discriminação entre condições biológicas normais e anormais [3]. Classificam-se em biomarcadores de exposição, de efeito e de susceptibilidade genética [4]. Os biomarcadores de exposição reflectem a concentração do agente químico no ambiente, dizendo-se biomarcador de exposição externa; ou no organismo, biomarcador de exposição interna. São exemplos de biomarcadores genotóxicos, inseridos nos biomarcadores de efeito, os micronúcleos, as pontes nucleoplásmicas e as protusões nucleares. De forma geral, a susceptibilidade genética de cada indivíduo influencia quer a acção dos biomarcadores de exposição quer a dos de efeito, e são exemplos disso a álcool desidrogenase 3 (ADH3), enzima envolvida no metabolismo do formaldeído e o gene envolvido na reparação de quebras de cadeias duplas do DNA, *X – Ray Cross-Complementation 3* (XRCC3).

2.1. FORMALDEÍDO

O formaldeído, metanal segundo a designação da *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC), é um gás incolor, reactivo, inflamável, com um odor forte e bastante característico, podendo formar com o ar misturas explosivas [5, 6, 7, 8, 9].

Comercialmente, o formaldeído é produzido como uma solução aquosa designada de formalina, contendo cerca de 37 a 40% de formaldeído [10].

O formaldeído está presente em baixas concentrações na maioria dos organismos vivos. Quantidades fisiológicas de formaldeído são formadas endogenamente a partir da desmetilação dos grupos N-, O- e S- de aminoácidos como a serina, glicina, metionina e

colina. O formaldeído exógeno é rapidamente metabolizado após absorção. Esta pode ocorrer pelas vias oral, dérmica ou inalatória, dependendo a quantidade absorvida da via de exposição [7]. A destoxificação ocorre rapidamente via formação de formato de dióxido de carbono [11].

Os primeiros indícios de carcinogenicidade do formaldeído foram tornados públicos pelo *Chemical Industry Institute of Toxicology* (CIIT) nos Estados Unidos em 1978, que relata o desenvolvimento de carcinoma nasal em ratos laboratorialmente expostos a esta substância [5]. Em 1987, a *Environmental Protection Agency* (EPA) classificou o formaldeído como substância cancerígena em exposições elevadas e muito prolongadas [6]. A *International Agency for Research on Cancer* (IARC), realizou várias avaliações desde 1981, concluindo em 2004 que o formaldeído é um provável carcinogénio em humanos (grupo 2A), e apenas em 2006 o formaldeído foi considerado agente carcinogénico (Grupo 1) com base na evidência de que a exposição a esta substância é susceptível de causar cancro nasofaríngeo em humanos [5], mas sem evidência suficiente para causar leucemia e carcinoma sinonasal [6]. É igualmente considerado como agente cancerígeno pela OSHA e pelo NIOSH.

A exposição ocupacional a formaldeído ocorre numa grande variedade de sectores profissionais, quer a nível industrial quer hospitalar. A inalação de vapores pode induzir a irritação dos olhos, nariz e tracto respiratório superior [10]. A exposição ocupacional a elevadas concentrações de formaldeído pode conduzir a irritação respiratória, reacções asmáticas e agravamento de casos pré-existentes de asma. Após a exposição, reacções dermatológicas são também muito comuns, uma vez que este agente químico além de irritante é também alergénio [6]. O formaldeído induz efeitos citotóxicos e genotóxicos em células de bactérias e mamíferos [12] sendo a sua genotoxicidade e carcinogenicidade comprovada em modelos *in vitro*, em animais e humanos [6, 11], através de ligações cruzadas DNA-proteína, aberrações cromossómicas, trocas entre cromátídeos-irmãos e micronúcleos [10].

Devido às suas características químicas, o formaldeído tem sido utilizado como preservante e desinfectante, salientando-se a sua utilização para embalsamação de cadáveres e na conservação e fixação de tecidos em hospitais e laboratórios [5], nomeadamente nos serviços hospitalares de Anatomia Patológica.

Os Serviços de Anatomia Patológica têm como finalidade principal realizar um diagnóstico a partir de vários tipos de material biológico que são removidos de um indivíduo, seja sob a forma de biopsia, peça cirúrgica ou necrópsia. O formaldeído é utilizado para preservar as amostras biológicas, de efeitos como autólise e putrefacção bacteriana, que normalmente decorreriam caso o material biológico não fosse submerso em formaldeído, na etapa designada de fixação.

Os laboratórios de Anatomia Patológica, sedeados na sua grande maioria em instituições hospitalares, são locais de importante exposição ocupacional ao formaldeído, nomeadamente por médicos patologistas, técnicos de Anatomia Patológica e auxiliares de acção médica. Os profissionais contactam com esta substância durante o exame macroscópico do material biológico, na diluição da solução de formaldeído (quando não realizada comercialmente), mudança deste reagente em equipamentos onde este seja utilizado e na limpeza da mesa de entradas, onde decorre o exame macroscópico.

2.2. BIOMARCADORES GENOTÓXICOS

O cancro é uma doença complexa em que células com expressão génica alterada, proliferam anormalmente, metastizam outros tecidos e possuem funções anómalas. Existem mutações críticas em apenas um gene que aceleram a divisão celular e inibem a morte celular, alterando o equilíbrio entre proliferação celular e apoptose. Estes fenómenos encontram-se muito bem estudados e documentados em determinados tipos de cancros. Todavia, o número crítico de mutações acumuladas em células cancerígenas não pode ser simplesmente explicado pela taxa de mutações e tem sido proposto que as mutações conduzem à hipermutabilidade e são responsáveis pela carcinogénese [2]. Se assim for, a indução de instabilidade genómica será um evento crucial e precoce para o desenvolvimento da carcinogénese, responsável pela progressão de uma célula normal para cancerígena.

O desenvolvimento do cancro requer em geral vários anos a décadas, existindo por isso interesse em determinar biomarcadores de dano de DNA que possam ser preditivos de risco de cancro. Segundo Hulka (1990), os marcadores biológicos, ou biomarcadores, podem ser definidos como *alterações celulares, bioquímicas ou moleculares mensuráveis em meios biológicos, tais como tecidos, células ou fluidos* [13].

Exemplos dos biomarcadores de dano de DNA correntemente utilizados em estudos de células humanas *in vitro* ou *in vivo* são: quebras nas cadeias de DNA, aberrações cromossómicas, ensaio dos micronúcleos por bloqueio da citocinese, aneuploidia, encurtamento de telómeros, aductos de DNA, oxidação de DNA, metilação de DNA, entre outros [2]. As aberrações cromossómicas, as trocas de cromátídeos-irmãos e os micronúcleos em linfócitos do sangue periférico são muito utilizados como biomarcadores citogenéticos de efeitos genotóxicos [14].

2.2.1. MICRONÚCLEOS

Durante a divisão celular o material genético contido no núcleo replica e divide-se equitativamente pelas duas células-filhas recém formadas. Durante este processo,

sobretudo na replicação e divisão do material genético, podem ocorrer erros, potenciados por agentes genotóxicos, que levam a danos cromossômicos. Desta forma, pode ocorrer separação desigual do material genético e existir material genético que é excluído ou não se incorpora correctamente no núcleo da célula-filha, originando um núcleo de menores dimensões designado de micronúcleo [2]. Os micronúcleos originam-se a partir de fragmentos de cromossomas, cromossomas totais ou mais frequentemente de fragmentos de cromossomas acêntricos que se “perdem” na anáfase durante a divisão celular [15], não sendo incluídos no núcleo das células filhas na telofase [16]. Quando o conteúdo dos micronúcleos são fragmentos de cromossomas, estes podem ser resultado directo de quebra da cadeia dupla de DNA, conversão de quebras nas cadeias simples de DNA em quebras na cadeia dupla após a replicação celular ou inibição da síntese de DNA. Os micronúcleos que são formados por cromossomas inteiros, têm a sua origem em defeitos na maquinaria de segregação de cromossomas, tais como deficiências nos genes que controlam o ciclo celular, falha no fuso mitótico, cinetócoro ou outras entidades do aparato mitótico, dano em sub-estruturas cromossômicas, disrupção mecânica e hipometilação de DNA centromérico [16].

A combinação entre o estudo dos micronúcleos e *Fluorescent in situ Hybridization* (FISH) com recurso a sondas específicas para a região pan (peri-) centromérica dos cromossomas fornece uma metodologia que permite distinguir entre micronúcleos que contêm cromossomas totais (micronúcleos com centrómero positivo) ou fragmentos acêntricos (micronúcleos com centrómero negativo) [16, 17].

Este ensaio é muito sensível, uma vez que permite a discriminação entre agentes mutagénicos que induzem as quebras no DNA – clastogénicos, ou que induzem à perda/não disjunção de cromossomas – aneugénicos [16]. Os agentes clastogénicos induzem a formação de micronúcleos por quebra da dupla hélice de DNA, formando-se fragmentos acêntricos incapazes de aderência às fibras do fuso mitótico e integração nos núcleos das células-filhas. No caso de cromossomas inteiros com cinetocoros danificados, não podem ligar-se aos microtúbulos que puxam os cromátídeos para cada célula-filha durante a mitose, permanecendo no exterior do novo núcleo formado. Estes danos podem ser provocados para agentes químicos que reagem com as proteínas constituintes dos cinetocoros. Agentes aneuploidogénicos são químicos que impedem a formação do fuso mitótico. Estes agentes provocam a formação de células multinucleadas, em que cada núcleo contém um número diferente de cromossomas, bem como a exclusão de cromátídeos inteiros do núcleo da célula, formando micronúcleos. Assim, através da simples análise de micronúcleos é possível a distinção entre agentes clastogénicos e aneugénicos [18,19].

Os micronúcleos nas células são uma mistura de formas transcricionais activas e inactivas, no entanto a maioria dos casos, estes apresentam níveis de actividade transcricional indetectáveis. Sendo assim, genes contidos nos micronúcleos inactivos têm a sua actividade funcional perdida e indisponível para a manutenção geral da célula [20].

O destino dos micronúcleos após a sua formação é pouco conhecido. No entanto, o destino após mitose inclui: eliminação de células com micronúcleos por apoptose, expulsão da célula quando o DNA que constitui os micronúcleos não é funcional ou capaz de replicação e sem os componentes citoplasmáticos necessários, reincorporação do núcleo principal (podendo resultar em actividade biológica normal), retenção dentro do citoplasma da célula com uma entidade extranuclear, quando os micronúcleos podem completar um ao mais ciclos de replicação de DNA/cromossoma [16].

2.2.2. PONTES NUCLEOPLÁSMICAS

A análise de pontes nucleoplásmicas foi validada como biomarcador de dano de DNA no estudo de Umegaki & Fenech [21], em células humanas WIL2-NS, linha celular de linfoblastos B, tratadas com peróxido de hidrogénio e superóxidos, após co-incubação com neutrófilos humanos activados.

As pontes nucleoplásmicas são originadas quando os cromossomas ou cromátídeos dicêntricos são puxados para pólos opostos da célula durante a anáfase, sendo indicativas de má reparação do DNA, rearranjos cromossómicos, fusão de telómeros [22] e a não reparação do dano no genoma resultante de quebras nas cadeias de DNA [23]. A não reparação de quebras em dois cromossomas pode conduzir a um rearranjo cromossómico assimétrico tendo como produto final um cromossoma dicêntrico e um fragmento acêntrico. Raramente é possível observar pontes durante a anáfase antes da membrana nuclear estar formada, uma vez que as células rapidamente terminam a etapa da anáfase e telófase, completando a citocinese e no final, geralmente ocorre quebra da ponte nucleoplásmica quando as células-filhas se separam [17, 24]. As pontes nucleoplásmicas podem quebrar e formar micronúcleos [17,22]. Em cerca de 40% dos casos de micronúcleos, dois ou mais destes são formados a partir de uma única ponte nucleoplásmica. Quando dois micronúcleos são observados após a resolução de uma ponte nucleoplásmica, normalmente permanece um micronúcleo em cada célula-filha [20].

A contagem de pontes nucleoplásmicas fornece evidências directas do dano no genoma resultante da não reparação de quebras nas cadeias de DNA [22].

2.2.3. PROTUSÕES NUCLEARES

As protusões nucleares representam material nuclear que mimetiza um micronúcleo e encontra-se associado ao núcleo principal através de uma conexão nucleoplásmica. É

constituído por DNA amplificado, que se localiza selectivamente em locais específicos na periferia do núcleo. O DNA amplificado pode ser eliminado via recombinação entre regiões homólogas com sequências amplificadas, formando os minicírculos de DNA acêntrico e atelomérico (duplos minutos), localizados em regiões distintas do núcleo ou como excisão de sequências amplificadas depois da segregação para regiões distintas do núcleo [22, 23]. Estes fenómenos sugerem que o núcleo possui capacidade de detectar o excesso de DNA, desencadeando processos de reparação de DNA e activando genes *housekeeping* nucleares. Shimizu *et al.* [24] sugerem que o núcleo elimina o excesso de DNA amplificado através de um processo activo que concentra DNA amplificado num ponto periférico do núcleo, sendo posteriormente excluído da célula por extrusão formando uma “mini célula”. O processo da formação das protusões nucleares ocorre durante a fase S e a duração deste processo e extrusão permanece desconhecido [22, 24, 25].

A génese da formação de protusões nucleares e micronúcleos é muito próxima. Assim, foi proposto que qualquer DNA que fique no citoplasma, na mitose é encapsulado pela membrana nuclear na fase S durante a reconstituição do envelope nuclear e síntese de DNA, formando uma protusão nuclear. Esta protusão nuclear pode desintegrar-se do núcleo e formar um micronúcleo [17].

2.3. TESTE DOS MICRONÚCLEOS

O teste dos micronúcleos por bloqueio da citocinese, é o método eleito para quantificar micronúcleos em culturas de células humanas, uma vez que a contagem restringe-se especificamente a células que se dividiram apenas uma vez. Estas células são reconhecidas pela sua aparência binucleada após a inibição da citocinese pela citocalasina B.

O teste dos micronúcleos é um sistema extensivamente utilizado para determinar o dano potencial em células humanas por agentes químicos sendo, portanto, um bom modelo para a monitorização humana, uma vez que é exequível a avaliação e comparação de vários biomarcadores de genotoxicidade. Com os novos desenvolvimentos, actualmente, este método também é utilizado para medir pontes nucleoplásmicas, biomarcador de re-arranjo cromossómico e, protusões nucleares, biomarcador de amplificação génica [22].

Em estudos de biomonitorização em humanos, o teste dos micronúcleos é muito utilizado como biomarcador genotóxico de exposição e efeitos biológicos precoces, quer em cultura de linfócitos como em células epiteliais [26]. Estas últimas, tem a grande vantagem de podem ser facilmente colhidas da boca, nariz e bexiga, através de procedimentos não invasivos. Para além deste facto, cerca de 90% dos cancros tem origem epitelial e, em muitos casos, são estes tecidos os locais alvos dos agentes carcinogénicos por exposição directa, seja inalação, ingestão ou contacto com os seus metabolitos (urotélia) [27].

2.4. ASSOCIAÇÃO PREDITIVA COM DESENVOLVIMENTO DE CANCRO

A maioria dos tumores apresenta cariótipos anormais, envolvendo re-arranjos cromossômicos e/ou aneuploidia. O número anormal de cromossomas pode ocorrer por uma variedade de mecanismos, tais como: o número anormal de centríolos que conduz a mitoses multipolares, a perda de cromossomas durante a anafase como resultado de defeitos no cinetocoro, a malsegregação de cromossomas durante a anafase como resultado do defeito na separação dos cromátídeos, a inibição da mitose conduzindo à formação de células tetraplóides e a falha na citocinese por defeitos na montagem de microfilamentos [2,28].

A hipótese de uma associação preditiva entre a frequência de micronúcleos em linfócitos cuja citocinese foi bloqueada e o desenvolvimento de cancro é suportada por várias premissas [29]:

1. A associação entre a frequência de micronúcleos e o risco de cancro foi aferida pelas semelhanças mecánísticas entre aberrações cromossômicas e micronúcleos, as quais se mostraram ser preditivas de cancro;
2. Elevada concordância observada entre os métodos de aberrações cromossômicas e micronúcleos em estudos *in vitro*;
3. Aumento da frequência de micronúcleos é observado em linfócitos de pacientes com cancro e em pacientes com síndrome de Bloom e Ataxia Telangiectasia;
4. Frequência de micronúcleos está associada significativamente com uma concentração baixa de vitaminas, como o folato, no sangue, cujas deficiências estão associadas a um aumento do risco de alguns cancros;
5. Relação directa entre a frequência de micronúcleos e estádios precoces da carcinogénese, com no caso de cancro cervical;

Estudos desenvolvidos por Bonassi *et al.* [30] suportam a hipótese de a frequência de MN nos linfócitos do sangue periférico ser um biomarcador de risco de cancro. Alterações da estrutura do núcleo como micronúcleos, pontes nucleoplásmicas, são eventos comumente visualizados em estádios precoces de carcinogénese. Níveis elevados de micronúcleos são indicativos de defeitos na reparação de DNA e na segregação de cromossomas.

2.5. POLIMORFISMOS GENÉTICOS

Os polimorfismos num único nucleótido (*Single-nucleotide polymorphism – SNP*) referem-se a diferenças numa única base na cadeia de DNA. São definidos como locais onde a variante menos comum possui uma frequência de pelo menos 1% na população, no entanto, em alguns casos variantes com frequência mais rara são igualmente importantes [31]. Com o aparecimento e desenvolvimento de novas tecnologias para a sequenciação de DNA e detecção de SNPs, podem ser detectadas pequenas inserções ou deleções de uma ou

mais bases. Os SNPs são úteis na descoberta de genes que contribuem para o aparecimento de doença, em dois aspectos: alguns alelos onde existem SNPs pertencem a sequências de DNA que causam diferenças na função ou regulação dos genes, contribuindo assim directamente para o processo de doença; o outro aspecto é o facto dos SNPs poderem ser úteis como marcadores genéticos e serem utilizados para encontrar SNPs funcionais devido às associações entre SNPs marcadores e SNPs funcionais [31, 32].

A observação de associações entre biomarcadores citogenéticos e risco de cancro em indivíduos aparentemente não expostos a xenobióticos, pode reflectir os efeitos da exposição a carcinogénios não identificados, dieta ou fontes endógenas ou ainda, deficiência em micronutrientes como o folato. Contudo, outra possibilidade é que podem existir polimorfismos genéticos que afectem o metabolismo do xenobiótico ou capacidade reparadora do DNA, modificando a resposta individual a genotóxicos e, conseqüentemente, a risco de cancro. Estão descritos vários polimorfismos que afectam o risco de vários tipos de cancro e o nível de biomarcadores de exposição e efeito [14, 33].

2.5.1. X-RAY REPAIR CROSS-COMPLEMENTATION GROUP 3

A reparação de DNA é um processo universal que ocorre nas células e que permite manter a integridade estrutural das moleculares de DNA constituintes dos cromossomas, face a danos provenientes do ambiente, bem como de processos metabólicos normais [34]. Desta forma, os sistemas de reparação de DNA possuem um papel importante na manutenção da integridade genómica. Quando o DNA se encontra danificado e não é reparado, as mutações são propagadas durante a replicação celular e em última instância pode despoletar a activação de proto-oncogenes, a inactivação de genes supressores de tumor ou a perda de heterozigotia [35].

Os polimorfismos em genes de reparação de DNA constituem um grupo de factores de susceptibilidade genética que podem influenciar o nível de alterações cromossómicas, por afectarem a reparação de várias lesões de DNA induzidas por agentes genotóxicos e radiação ionizante e UV [14]. Devido à importância de manter a integridade genómica para funções gerais ou mais especializadas das células, bem como na prevenção da carcinogenicidade, os genes que codificam para moléculas de reparação de DNA têm sido propostos como candidatos a genes de susceptibilidade para desenvolvimento de cancro [36, 37]. Existem numerosos genes envolvidos na reparação de quebras na cadeia dupla de DNA, no entanto, apenas dois possuem polimorfismos que têm sido estudados e objecto de estudos epidemiológicos acerca de risco de cancro, sendo um deles o *XRCC3* [36].

O *XRCC3* é um dos genes de reparação da cadeia de DNA que codifica para uma proteína que participa na reparação de quebras nas cadeias duplas de DNA de homólogos recombinados, na manutenção da estabilidade genómica e interage directamente com o

RAD51 [36, 38, 39, 40, 41, 42]. O *XRCC3* encontra-se no cromossoma 14, na região 14q32.3 e o polimorfismo mais investigado é a transição entre citosina e timina no exão 7 (*XRCC3-18067C> T*) [40, 41] e está descrito pelo menos um polimorfismo no codão 241 do *XRCC3* [43]. Esta variante, constituída por uma substituição de uma treonina por uma metionina na posição 241, tem sido proposta como um alelo de baixa penetrância associada a cancro da mama, pulmão, leucemia mielóide aguda e a risco reduzido de cancro do tracto aerodigestivo [43, 44, 45].

Estudos de mutagénese dirigida em que foram utilizadas células com deficiências no *XRCC3*, descrevem evidência de aumento de mal segregação de cromossomas, devido ao aumento do número de centrómeros; levando à formação de fusos mitóticos multipolares, segregação de cromossomas aberrante, aneuploidia, formação de células binucleadas e diminuição da apoptose [43].

Existem ainda estudos que sugerem associação entre polimorfismo no *XRCC3* e risco de cancro – concretamente, carcinoma da bexiga, melanoma. No entanto, outros estudos não encontraram associação, como no caso do cancro do pulmão [36], embora um risco aumentado seja evidente em indivíduos com hábitos tabágicos pesados que possuem a variante *XRCC3 Thr/Thr* [46].

2.5.2. ÁLCOOL DESIDROGENASE 3

Os polimorfismos genéticos em enzimas metabolicamente importantes podem conduzir a derivas relevantes no balanço da activação e inactivação e, subsequentemente, a alteração da susceptibilidade individual à doença.

Uma das enzimas mais importantes na metabolização do etanol (cerca de 80-90%) é a álcool desidrogenase (ADH). Esta enzima encontra-se codificada por sete genes localizados no cromossoma 4. A enzima exhibe vários polimorfismos, existindo em humanos aproximadamente 20 isoenzimas que possuem diferenças a nível estrutural e funcional, em termos de propriedades cinéticas e de distribuição no organismo, dividindo-se em cinco classes. A classe I de isoenzimas localiza-se em três *loci* de genes: *ADH1*, *ADH2*, *ADH3* os quais geram as subunidades α , β e γ , respectivamente. A *ADH3* encontra-se no exão 8 e possui dois alelos, *ADH3*1* e *ADH3*2*, que possuem as subunidades γ_1 e γ_2 , respectivamente [47]. A subunidade γ_1 difere da γ_2 em duas substituições de aminoácidos, uma arginina por uma glutamina na posição 271 e uma isoleucina por uma valina na posição 349 [48]. O aminoácido isoleucina encontra-se na *ADH3*1* e o aminoácido valina na *ADH3*2*. A enzima produzida pela *ADH3*1* possui um V_{max} maior (88 μ M/min) que a enzima produzida pela *ADH3*2* (35 μ M/min) [49, 50].

Existem vários estudos relatando que indivíduos com a variante *ADH3*1* possuem maior risco de desenvolvimento de cancro ligado a consumo de álcool do que a *ADH3*2* [51],

contudo, estudos caso-controlo relatam que a variante ADH3*1 predomina nos controlos [49].

A ADH3, também conhecida como desidrogenase do formaldeído dependente de glutationa, pertencente à família da álcool desidrogenase (ADH; EC 1.1.1.1.), é a enzima mais envolvida na oxidação do formaldeído, especialmente na mucosa bucal, tendo sido sugerido que possui a função metabólica capaz de conferir protecção [52]. De uma forma geral, as álcool desidrogenases em mamíferos são metaloenzimas diméricas e citosólicas com cerca de 375 aminoácidos, dois átomos de zinco e massa molecular de cerca de 40 kDa por subunidade. Cada subunidade possui dois domínios, catalíticos e de ligação, entre os quais uma fenda hidrofóbica forma o sítio activo.

Estudos realizados por Dicker *et al.*, sugerem que a ADH3 é a enzima predominante e responsável pela oxidação do formaldeído em níveis baixos a moderados, enquanto que as aldeído desidrogenases com baixos K_m contribuem em situações que as concentrações de formaldeído são elevadas. Excluindo níveis de exposição extremos, a ADH3 é provavelmente a primeira guardiã contra o formaldeído, especialmente na mucosa oral [52].

3. METODOLOGIA

3.1. TIPO DE ESTUDO

Este projecto de investigação enquadra-se num estudo do tipo descritivo-correlacional, uma vez que consiste numa tentativa de explorar, medir e descrever associações entre as variáveis [53].

3.2. LOCAL DO ESTUDO

As colheitas foram realizadas nos laboratórios hospitalares de Anatomia Patológica da região de Lisboa e Vale do Tejo e nas instalações da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa (ESTeSL). O trabalho laboratorial foi desenvolvido nos laboratórios de Anatomia Patológica e de Genética da ESTeSL.

3.3. AMOSTRAGEM

Foram constituídas duas amostras: os casos e os controlos. Os casos são trabalhadores expostos a formaldeído nos laboratórios de Anatomia Patológica de seis hospitais da região de Lisboa e Vale do Tejo, num total de 56 indivíduos. Os controlos são estudantes, docentes e pessoal não docente da ESTeSL, num total de 85 indivíduos não expostos.

O método de amostragem usado para a toma de indivíduos expostos (os casos), foi o método de amostragem por conveniência, pois a amostra abarcou apenas os indivíduos que aceitaram participar no estudo. Quanto aos controlos, a amostragem foi dirigida a indivíduos

que não apresentassem exposição profissional a formaldeído e, simultaneamente, fossem estatisticamente comparáveis aos casos.

3.4. VARIÁVEIS EM ESTUDO

As variáveis deste estudo encontram-se sistematizadas na tabela 1.

Tabela 1 – Variáveis em estudo para a verificação de uma possível associação entre a exposição ocupacional a FA e biomarcadores genotóxicos e polimorfismos genéticos.

Variável	Tipo de medida	Escala	Tipo de variável
Idade	Quantitativa	Métrica	Atributo
Género	Qualitativa	Nominal	Atributo
Hábitos tabágicos	Quantitativa	Intervalo	Independente
Consumo de álcool	Quantitativa	Intervalo	Independente
Exposição a formaldeído	Qualitativa	Nominal	Independente
Polimorfismo ADH3	Qualitativa	Nominal	Independente
Polimorfismo XRCC3	Qualitativa	Nominal	Independente
Micronúcleos	Quantitativa	Razão	Dependente
Pontes nucleoplásmicas	Quantitativa	Razão	Dependente
Protusões nucleares	Quantitativa	Razão	Dependente

3.5. INSTRUMENTOS DE RECOLHA DE DADOS

Os métodos de colheita de dados utilizados para atingir os objectivos propostos tiveram como base tanto medidas subjectivas, nomeadamente o questionário e uma lista de observação; como medidas objectivas, tais como os procedimentos laboratoriais realizados.

3.5.1. QUESTIONÁRIO

Os indivíduos amostrados preencheram um questionário constituído por perguntas de diversas tipologias, incluindo dados como: idade, género, hábitos tabágicos, consumo de álcool, medicação, doenças hereditárias, exposição a formaldeído e outros agentes químicos, actividade profissional, utilização de equipamento de protecção individual e colectiva e, ainda actividades nos tempos livres. O questionário foi validado, através da aplicação de um pré-teste a um grupo de indivíduos pertencentes à população em estudo e de seguida foi aplicado à amostra (Anexo I).

3.5.2. LISTA DE OBSERVAÇÃO

A lista de observação consiste no instrumento de recolha de dados utilizado aquando a visualização das lâminas ao microscópio óptico composto. Esta encontra-se dividida em vários parâmetros, sendo estes: o número de células visualizadas, micronúcleos, pontes nucleoplásmicas, protusões nucleares e observações que sejam consideradas relevantes como apoptose e necrose. Os critérios de classificação destas estruturas são os estabelecidos e validados pelo Projecto Internacional colaborativo *HUman MicroNucleus* (HUMN) disponível em <http://www.humn.org> [11].

3.5.3. PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS

Para cada grupo – casos e controlos – foram recolhidos dois tipos de material biológico: sangue periférico, obtido por venopunctura e células epiteliais esfoliadas da mucosa bucal, obtidas por zaragatoa. As células epiteliais foram exclusivamente utilizadas para a mensuração de micronúcleos. O sangue periférico foi utilizado em diversos procedimentos, nomeadamente na cultura de linfócitos para mensuração de micronúcleos, pontes nucleoplásmicas e protusões nucleares; extracção de DNA para verificação dos polimorfismos nos genes XRCC3 e na enzima ADH3.

3.5.3.1. CULTURA DE LINFÓCITOS

Foram colhidos 10 ml de sangue periférico de cada indivíduo para tubos Falcon de 15 ml com heparina (10U/ml de sangue) como agente anticoagulante. Posteriormente, realizou-se o isolamento dos linfócitos através de um gradiente de concentrações utilizando Ficoll-Paque Plus (Amersham Biosciences) e foram cultivados em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino e antibióticos (50µg/ml de streptomina e 50U/ml de penicilina). A divisão dos linfócitos foi estimulada por um agente mitogénico (Fitohemaglutinina 10 µl/ml), sendo as células incubadas durante 44h na estufa a 37°C com 5% de CO₂. Após o período de estimulação, a citocinese foi bloqueada utilizando um agente inibidor da polimerização dos filamentos de actina (citocalasina 6 µl/ml), que actuou durante 28h. Este mecanismo induz a mitose e inibe a citocinese, ficando as células com aparência binucleada. Finalmente, os linfócitos foram recolhidos e projectados em lâminas de vidro recorrendo a *cytospin* (Cyto-Tek® Sakura). As lâminas foram coradas com a técnica de May-Grünwald Giemsa (MGG), a qual utiliza como corantes as soluções de May-Grünwald, que cora o núcleo de azul e o citoplasma basófilo de rosa; e Giemsa que aumenta a coloração nuclear e a capacidade de demonstrar selectivamente determinadas estruturas celulares. A análise microscópica efectuou-se em MOC ZEISS Axioskop40, com óleo de imersão e ampliação

1000X, por dois observadores independentes. Cada observador visualiza 500 células binucleadas por indivíduo, perfazendo um total de 1000 células por cada indivíduo estudado.

3.5.3.2. POLIMORFISMOS GENÉTICOS

Para a pesquisa dos polimorfismos genéticos em estudo – XRCC3 e ADH3 –usaram-se dois processos comuns: a extracção de DNA a partir de sangue periférico através da técnica de fenol-clorofórmio e o tratamento das amostras de DNA extraídas pela enzima heparinase. Este último procedimento deveu-se ao facto de as amostras recolhidas por venipunctura terem sido colocadas na sua totalidade em tubos Falcon contendo como anti-coagulante a heparina, inibidor da reacção de PCR. Descrevem-se em seguida ambos os procedimentos.

3.5.3.2.1. EXTRACÇÃO DE DNA DE SANGUE PERIFÉRICO PELA TÉCNICA DE FENOL-CLOROFÓRMIO

Foi retirado 400 µl de cada amostra de sangue periférico e colocado num *ependorf* com igual volume de tampão de lise (100 mM Tris-HCL pH 8; 10 mM EDTA; 100 mM NaCl; 0.1% SDS) e 5µl de proteinase K 20 mg/ml e colocado a incubar a 56°C *overnight*. Posteriormente, foram realizadas centrifugações sucessivas (13.000g, 10 minutos) com fenol, fenol/clorofórmio e clorofórmio, respectivamente, com transferência do sobrenadante para um novo *ependorf*. No final, adicionou-se 40 µl de Acetato de sódio 3M pH 5.0 e 800 µl de etanol absoluto gelado e colocou-se a -80°C durante 15 minutos. Após centrifugação (13.000g, 15 minutos), descartou-se o sobrenadante, lavou-se o *pellet* com etanol a 70% e centrifugou-se a 4°C (13.000g, 10 minutos). O *pellet* formado foi seco numa estufa a 37°C e ressuspendido em 100 µ de água ultrapura e armazenado a -20°C.

3.5.3.2.2. EXTRACÇÃO DE DNA DE CÉLULAS EPITELIAIS

A utilização de células epiteliais para extracção de DNA, comumente empregue em Medicina Forense, tem a grande vantagem, comparativamente ao sangue periférico, do método de obtenção do material não ser invasivo.

Este procedimento foi realizado devido à impossibilidade da colheita de sangue em dois indivíduos, pertencentes ao grupo controlo. Desta forma, foi pedido aos indivíduos que bochechassem uma solução salina de NaCl a 0,9% e despejassem o conteúdo para um copo de plástico devidamente identificado. Após a realização de centrifugações, é adicionado chelex à solução. O chelex é uma resina quelante que permite realizar uma extracção de DNA rápida, barata e efectiva.

3.5.3.2.3. TRATAMENTO COM HEPARINASE I

Existem várias substâncias que podem inibir fortemente a reacção de PCR, tais como: proteinase K, fenol, agentes quelantes (EDTA), hemoglobina e outras proteínas das hemácias, elevadas concentrações de sais, SDS e heparina.

Uma vez que em todas as amostras colhidas por venipunctura utilizou-se heparina como agente anti-coagulante, como descrito na cultura de linfócitos, foi necessário proceder ao tratamento com heparinase I. A heparina interfere com a transcrição de DNA na reacção de PCR e com a transcrição reversa do RNA. Este tratamento consiste na dissolução da enzima heparinase I em solução tampão própria (20 mM Tris-HCL, pH 7.5, 50 mM NaCl, 4 mM CaCl₂ and 0.01% BSA) e na adição de 0,83 µl desta solução e 2µl de ddH₂O a cada 7,2 µl de DNA extraído, durante 2h à temperatura de 25°C.

3.5.3.2.4. ESTUDO DO POLIMORFISMO XRCC3 T241M POR PCR EM TEMPO REAL

O estudo do genótipo apresentado relativamente ao polimorfismo XRCC3 T241M foi efectuado pela técnica de PCR em Tempo Real, utilizando o *iCycler iQ® Multicolor Real-Time PCR Detection System* (BIO-RAD) com um programa especificado na tabela 2.

Tabela 2 – Programa utilizado para aplicação da técnica de PCR em tempo real para o polimorfismo XRCC3 T241M.

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo	Repetições
1º	50	2 min	-
2º	95	30 s	-
3º	95	30 s	2
4º	95	10 min	-
5º	92 60	15s 1 min	50
6º	4	-	-

Os primers utilizados foram: 5' GAAGGCACTGCTCAGCTCACGCAGC 3' (*forward*) e 5' TGGCCCCCAGGGACTGCAGATGCCT 3' (*reverse*).

A solução de reacção de PCR era constituída por 10 µl de *TaqMan Universal PCR Master Mix* e 1 µl de sonda específica para o polimorfismo em estudo (rs861539, Applied Biosystems), 5 µl de água destilada e 4 µl de DNA em estudo, perfazendo um volume total de 20 µl. É de valor referir que a sonda e a *TaqMan Universal PCR Master Mix* foram mantidas em gelo durante todo o processo de preparação da solução de reacção. Todos os componentes da solução de reacção foram armazenados a -20°C excepto a *TaqMan Universal PCR Master Mix* que foi armazenada a 4°C.

3.5.3.2.5. ESTUDO DO POLIMORFISMO DA ADH3 ILE349VAL POR PCR-RFLP

Para a genotipagem da ADH3 foi utilizado o método de PCR-RFLP (*PCR-restriction fragment length polymorphism*) com enzima de restrição *SspI*. Os *primers* utilizados para a amplificação foram: *Forward* (5'-GCTTTAAGAGTAAATATTCTGTCCCC-3') e *Reverse* (5'-AATCTACCTCTTTCCSGAGC-3'). A solução de reacção de PCR total foi de 20 µl: 1 µl de DNA, 0,66 µl de cada primer, 2 µl de dNTP, 2 µl de MgCl₂, 2 µl de tampão 1x PCR com (NH₄)₂SO₄ e 0,4 µl de *Taq* 5U/ µl (Fermentas). A reacção de PCR foi realizada no termociclador (Biometra®) no programa apresentado na tabela 3.

Tabela 3 – Programa utilizado para aplicação da técnica de PCR para o polimorfismo da ADH3 Ile349Val.

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo	Repetições
1º	95	5 min	-
2º	94	30 s	35
3º	55	30 s	-
4º	72	30 s	-
5º	72	10 min	-

Todos os produtos de PCR foram aplicados num gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio, de forma a observar se existiu uma correcta amplificação.

Os produtos amplificados foram digeridos com 1 µl de *SspI* 10 U/µl (Fermentas) em 30 µl de solução total durante 16h (*overnight*) a 37°C. Após a digestão, os produtos digeridos foram submetidos a electroforese em gel de agarose a 4%, corado com brometo de etídio, realizando-se a genotipagem. Todos os géis realizados foram observados através de lâmpada UV e devidamente documentados em registos fotográficos.

3.5.3.3. CÉLULAS EPITELIAIS

A colheita do material consistiu na raspagem da mucosa bucal com recurso a escova de citologia (*endobrush*) e, conseqüente realização de esfregaço em lâmina de vidro. Os esfregaços foram fixados por pulverização com Mercifix®, à base de metanol. A coloração das lâminas fez-se pela técnica de Feulgen, sem contraste e secas ao ar. Esta técnica permite a demonstração altamente selectiva de DNA. Para que essa reacção aconteça é necessária uma hidrólise ácida com Ácido clorídrico a 5M, que tem como intuito a separação selectiva das bases purinas – adenina e guanina da molécula de DNA. Os grupos aldeídos formados nesta etapa coram de púrpura por acção do Reagente Shiff. Para cada indivíduo foram realizadas duas lâminas. A análise microscópica foi efectuada em 2000 células, por dois observadores independentes em MOC ZEISS Axioskop40, com óleo de imersão e ampliação 1000X, segundo os critérios definidos por Tolbert *et al.* [54].

3.5.4. PROCEDIMENTOS ESTATÍSTICOS

Os procedimentos estatísticos aplicados visam investigar a existência de associação entre níveis de alterações nucleares (micronúcleos, pontes nucleoplásmicas e protusões nucleares), aqui conceptualizadas como variáveis dependentes, e possíveis factores de risco (ou variáveis independentes) tais como hábitos tabágicos, consumo de álcool e polimorfismos no gene de reparação de DNA XRCC3 e na enzima metabólica ADH3. Consideraram-se sempre três níveis nas variáveis dependentes: 0 alterações estruturais, 1 a 3 alterações, e mais de 3 alterações. O estabelecimento de associação entre as alterações nucleares e os factores de risco foi efectuado através do modelo de Regressão Ordinal Múltipla, com função de ligação *Logit*, recorrendo ao *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) versão 15.0. Recorreu-se ainda ao Excel® para o cálculo de *odds ratio* e intervalos de confiança, de acordo com a função de ligação *Logit*, que os outputs do SPSS não apresentavam. Para determinar a diferenciação génica e alélica e realizar o teste de Hardy-Weinberg, utilizou-se o software Genepop versão 4.0.10.

3.5.5. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS – LEGAIS

Este projecto foi realizado com a autorização dos Presidentes do Conselho de Administração, da Comissão de Ética e dos Directores de serviço dos laboratórios de Anatomia Patológica dos hospitais participantes, aos quais foi enviada uma carta explicativa, solicitando a respectiva autorização. Foram tidos em consideração os direitos da autonomia, ou seja, todos os participantes aderem de forma voluntária ao estudo; à privacidade, preservada através da confidencialidade do tratamento dos dados obtidos nos questionários. No âmbito da recolha do material biológico foi preenchido um termo de consentimento informado (Anexo II) prévio por todos os participantes que informa do objectivo da investigação, bem como da garantia de anonimato e confidencialidade dos dados estando de acordo com os princípios éticos e deontológicos.

4. RESULTADOS

A amostra foi constituída por 2 grupos: casos e controlos. Aos casos pertencem os trabalhadores expostos ocupacionalmente a formaldeído, num total de 56 indivíduos. Destes, 66% são do género feminino e 34% do género masculino e têm uma média de idade de 39,45 (\pm 11,5) anos. Os controlos são constituídos por 85 indivíduos sem

exposição a formaldeído em que 64% são do género feminino e 36% do género masculino e a média de idade é de 32,42 ($\pm 8,1$) anos. Estes resultados encontram-se na tabela 4.

Tabela 4 – Distribuição de características seleccionadas dos participantes do estudo.

	Expostos a FA (Casos)	Não Expostos a FA (Controlos)
N.º de indivíduos	56	85
Género		
Feminino	37 (66%)	54 (64%)
Masculino	19 (34%)	31 (36%)
Idade (anos)		
Range	20-61	20-53
Média	39,45	32,42
Desvio-padrão	11,5	8,1
Hábitos tabágicos		
C. nulo (0 cigarros/dia)	45 (80,36%)	60 (70,59%)
C. leve (< 10 cigarros/dia)	2 (3,57%)	13 (15,29%)
C. moderado (10-20 cigarros/dia)	4 (7,15%)	9 (10,59%)
C. pesado (>20 cigarros/dia)	5 (8,93%)	3 (3,53%)
Hábitos alcoólicos		
C. nulo	19 (33,93%)	19 (22,35%)
C. leve	21 (37,5%)	55 (64,71%)
C. moderado	16 (28,57%)	11 (12,94%)

Nota: C. - Consumo

Relativamente aos hábitos tabágicos, a maioria dos participantes, quer casos (80,36%) como os controlos (70,59%) possuem um consumo nulo no que concerne ao tabaco. De forma geral, casos e controlos apresentam hábitos leves de consumo de álcool.

De acordo com os resultados apresentados na tabela 5, verifica-se que todas as alterações nucleares apresentam valores mais elevados nos expostos comparativamente com os não expostos a formaldeído.

Tabela 5 – Resultados das alterações nucleares nas amostras de casos e controlos.

	Expostos a FA (Casos)	Não Expostos a FA (Controlos)
Micronúcleos em linfócitos		
Range	0-14	0-7
Média	3,96	0,81
Desvio-padrão	3,926	1,585
Pontes Nucleoplásmicas		
Range	0-15	0-3
Média	3,04	0,18
Desvio-padrão	3,917	0,516
Protusões Nucleares		
Range	0-13	0-1
Média	0,98	0,07
Desvio-padrão	2,040	0,258

Micronúcleos mucosa bucal		
Range	0-9	0-2
Média	0,96	0,16
Desvio-padrão	2,071	0,531

Não são observadas diferenças significativas nas frequências alélicas e nas frequências genótípicas nos polimorfismos XRCC3 Thr241Met e ADH3 Ile349Val entre a população exposta e não exposta (Teste X^2 Fisher, $p > 0,01$) como apresentado na tabela 6. A distribuição dos genótipos entre casos e controlos não obedece ao equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p < 0,05$).

Tabela 6 – Distribuição genotípica e alélica dos polimorfismos XRCC3 T241M e da ADH3 Ile340Val na amostra do estudo.

	Expostos a FA (Casos)	Não Expostos a FA (Controlos)	Valor de p
Genótipo XRCC3 Thr241Met			
Met/Met	13 (23,21%)	20 (24,69%)	0,6608
Thr/Met	24 (42,86%)	27 (33,33%)	
Thr/Thr	19 (33,93%)	34 (41,98%)	
Met Thr	48 (0,44) 60 (0,55)	67 (0,408) 97 (0,591)	0,6288
Genótipo ADH3 Ile349Val			
ADH3*1/ADH3*1	15 (26,79%)	16 (19,75%)	0,35309
ADH3*1/ADH3*2	35 (62,5%)	56 (69,14%)	
ADH3*2/ADH3*2	6 (10,71%)	9 (11,11%)	
Ile Val	65 (0,602) 43 (0,398)	90 (0,549) 74 (0,451)	0,4560

De acordo com os resultados da regressão ordinal apresentados na tabela 7, a idade ($p=0,004$), a exposição a formaldeído ($p < 0,001$) e o genótipo ADH3*1/ADH3*2 ($p=0,011$) influenciam de forma estatisticamente significativa, a observação de micronúcleos em linfócitos periféricos.

Tabela 7 – Micronúcleos (MN) em linfócitos periféricos. Resultados do ajuste da regressão logística quando a variável dependente tem 3 categorias de micronúcleos (0, 1-3, > 3 MN). Os factores de risco estão na 1ª coluna, abaixo dos dois “thresholds” da variável dependente. Nas colunas “Estimate” e “Std Error” estão, respectivamente, os coeficientes de regressão (B) e seus erros-padrão (SE). Os valores do teste Wald são $(B/SE)^2$ e testam-se por comparação com a distribuição Qui-quadrado com *df* graus de liberdade, indicando-se na coluna “Sig” o respectivo *p-value*. Nas colunas da direita estão limites do intervalo de confiança (95%) para os coeficientes de regressão.

	Estimate	Std. Error	Wald	df	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Threshold [MNlinf = 0]	-,465	1,402	,110	1	,740	-3,212	2,283
[MNlinf = 1]	1,445	1,405	1,059	1	,304	-1,308	4,198
Location Idade	,061	,021	8,078	1	,004	,019	,102
Género Feminino	,292	,414	,496	1	,481	-,520	1,104
Género Masculino	0 ^a	.	.	0	.	.	.
C. tabaco nulo	,371	,793	,218	1	,640	-1,184	1,925
C. tabaco leve	-,558	1,021	,299	1	,585	-2,560	1,444
C. tabaco moderado	-,019	,972	,000	1	,984	-1,924	1,885
C. tabaco pesado	0 ^a	.	.	0	.	.	.
C. álcool nulo	-,963	,589	2,673	1	,102	-2,119	,192
C. álcool leve	-,128	,568	,051	1	,822	-1,241	,985
C. álcool moderado	0 ^a	.	.	0	.	.	.
Sem Exposição FA	-2,039	,415	24,127	1	,000	-2,852	-1,225
Exposição FA	0 ^a	.	.	0	.	.	.
ADH3*1/ADH3*1	-1,283	,695	3,409	1	,065	-2,644	,079
ADH3*1/ADH3*2	-1,566	,616	6,471	1	,011	-2,772	-,359
ADH3*2/ADH3*2	0 ^a	.	.	0	.	.	.
XRCC3 Met/Met	-,318	,483	,434	1	,510	-1,264	,628
XRCC3 Thr/Met	,028	,423	,004	1	,947	-,802	,858
XRCC3 Thr/Thr	0 ^a	.	.	0	.	.	.

Link function: Logit.

a. This parameter is set to zero because it is redundant.

Os *odds ratio* (OR) foram calculados de forma habitual (e.g. para a idade, $OR = \exp(0.061) = 1.062$), bem como os correspondentes intervalos de confiança (tabela 8). Verifica-se que, em relação à idade, por cada 1 ano de idade a mais, existe um aumento da predisposição em 6,24% para a presença de micronúcleos em linfócitos periféricos. Os indivíduos não expostos a formaldeído, possuem uma diminuição da predisposição à presença de micronúcleos em cerca de 86,98%. Relativamente ao genótipo da enzima ADH3, os indivíduos heterozigóticos estão protegidos em cerca de 79,11% relativamente ao homozigótico ADH3*2/ADH3*2. O homozigótico ADH3*1/ADH3*1 também é apresentado como um factor de protecção (72,27%) em relação ao homozigótico ADH3*2/ADH3*2, embora sem relevância estatisticamente significativa.

Tabela 8 – Odds ratio (OR) e Intervalos de Confiança (IC) para os parâmetros significantes no estudo da variável dependente MN. O OR mede o quociente entre a probabilidade de se observarem classes de maior ordem (com mais micronúcleos) e a probabilidade de classes de menor ordem (com menos micronúcleos) quando aumenta 1 ano na idade, ou quando a Exposição a formaldeído (FA) não existe, ou quando se é heterozigótico ADH3*1/ADH3*2.

Parâmetro	OR	Intervalo de Confiança		%
		Limite Inferior	Limite Superior	
Idade	1,062400045	1,01896731	1,10768407	6,240005
Exposição a FA	0,130194243	0,057716213	0,29368768	-86,98058
ADH3*1/ADH3*2	0,20891651	0,062522542	0,698085952	-79,10835

No que respeita à associação entre a observação de pontes nucleoplásmicas e os factores de risco, a tabela 9 mostra que apenas a exposição a formaldeído ($p < 0,001$) e os hábitos leves de consumo de álcool ($p = 0,032$) são estatisticamente significativos.

Tabela 9 – Pontes nucleoplásmicas (NPB) em linfócitos periféricos. Resultados do ajuste da regressão logística quando a variável dependente tem 3 categorias de pontes nucleoplásmicas (0, 1-3, > 3 NPB). O significado das colunas é o mesmo que da tabela 7.

	Estimate	Std. Error	Wald	df	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Threshold [NPB = 0]	-1,638	1,556	1,109	1	,292	-4,687	1,411
[NPB = 1]	-,019	1,546	,000	1	,990	-3,050	3,012
Location							
Idade	-,035	,023	2,289	1	,130	-,081	,010
Género Feminino	,447	,508	,774	1	,379	-,549	1,444
Género Masculino	0 ^a	.	.	0	.	.	.
C. tabaco nulo	1,046	,896	1,364	1	,243	-,710	2,803
C. tabaco leve	,830	1,178	,497	1	,481	-1,478	3,138
C. tabaco moderado	,747	1,159	,416	1	,519	-1,524	3,018
C. tabaco pesado	0 ^a	.	.	0	.	.	.
C. álcool nulo	-,858	,625	1,887	1	,170	-2,083	,366
C. álcool leve	-1,373	,642	4,577	1	,032	-2,630	-,115
C. álcool moderado	0 ^a	.	.	0	.	.	.
Sem Exposição FA	-2,645	,494	28,686	1	,000	-3,613	-1,677
Exposição FA	0 ^a	.	.	0	.	.	.
ADH3*1/ADH3*1	,592	,856	,478	1	,489	-1,086	2,270
ADH3*1/ADH3*2	-,428	,794	,291	1	,589	-1,985	1,128
ADH3*2/ADH3*2	0 ^a	.	.	0	.	.	.
XRCC3 Met/Met	-,135	,579	,054	1	,816	-1,270	1,000
XRCC3 Thr/Met	,243	,486	,251	1	,617	-,709	1,195
XRCC3 Thr/Thr	0 ^a	.	.	0	.	.	.

Link function: Logit.

a. This parameter is set to zero because it is redundant.

A não exposição a formaldeído diminui em 92,9% a predisposição à existência de pontes nucleoplásmicas e os hábitos leves de consumo de álcool conferem protecção em cerca de 74,66% à existência de pontes nucleoplásmicas comparativamente com os hábitos pesados de consumo de álcool. Embora o não consumo de álcool apareça também como factor de protecção, não é um resultado estatisticamente significativo (tabela 10).

Tabela 10 – Odds ratio (OR) e Intervalos de Confiança (IC) para os parâmetros significantes no estudo da variável dependente NPB. O OR mede o quociente entre a probabilidade de se observarem classes de maior ordem (mais pontes nucleoplásmicas) e a probabilidade de classes de menor ordem (menos pontes nucleoplásmicas) quando a Exposição a formaldeído (FA) não existe, ou quando o consumo de álcool é leve (alcool = 1)

Parâmetro	OR	Intervalo de Confiança		%
		Limite Inferior	Limite Superior	
Exposição a FA	0,070980521	0,026960276	0,186876219	-92,90195
Álcool = 1	0,253407877	0,072051542	0,891244661	-74,65921

Os resultados da tabela 11 apresentam associações significativas entre a observação de protusões nucleares e o género (p=0,018), a exposição a formaldeído (p<0,001) e o genótipo heterozigótico do XRCC3 – Thr/Met (p=0,006).

Tabela 11 – Protusões nucleares (NBUD) em linfócitos periféricos. Resultados do ajuste da regressão logística quando a variável dependente tem 3 categorias de protusões nucleares (0, 1-3,> 3 NBUD). O significado das colunas é o mesmo que da tabela 7.

	Estimate	Std. Error	Wald	df	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Threshold [NBUD = 0]	,340	1,840	,034	1	,853	-3,266	3,947
[NBUD = 1]	3,839	1,964	3,822	1	,051	-,010	7,688
Location							
Idade	-,008	,029	,068	1	,794	-,064	,049
Género Feminino	1,731	,730	5,624	1	,018	,300	3,161
Género Masculino	0 ^a	.	.	0	.	.	.
C. tabaco nulo	-,526	1,027	,263	1	,608	-2,539	1,486
C. tabaco leve	-,910	1,520	,359	1	,549	-3,890	2,069
C. tabaco moderado	,203	1,358	,022	1	,881	-2,458	2,864
C. tabaco pesado	0 ^a	.	.	0	.	.	.
C. álcool nulo	-1,514	,795	3,631	1	,057	-3,072	,043
C. álcool leve	-1,295	,806	2,585	1	,108	-2,875	,284
C. álcool moderado	0 ^a	.	.	0	.	.	.
Sem Exposição FA	-2,216	,632	12,290	1	,000	-3,456	-,977
Exposição FA	0 ^a	.	.	0	.	.	.
ADH3*1/ADH3*1	-,096	,968	,010	1	,921	-1,993	1,800
ADH3*1/ADH3*2	-1,279	,904	2,000	1	,157	-3,051	,493
ADH3*2/ADH3*2	0 ^a	.	.	0	.	.	.
XRCC3 Met/Met	1,498	,802	3,491	1	,062	-,073	3,070
XRCC3 Thr/Met	1,971	,712	7,668	1	,006	,576	3,367
XRCC3 Thr/Thr	0 ^a	.	.	0	.	.	.

Link function: Logit.

a. This parameter is set to zero because it is redundant.

De acordo com os resultados apresentados na tabela 12, o facto de se pertencer ao género feminino, aumenta em 464,38% a predisposição para a observação de protusões nucleares.

Os indivíduos não expostos a formaldeído, possuem uma diminuição da predisposição à presença de protusões nucleares em cerca de 89,10%. O genótipo XRCC3 Thr/Met predispõe em 618,02% a existência de protusões nucleares relativamente ao genótipo

XRCC3 Thr/Thr enquanto que o genótipo XRCC3 Met/Met predispõe em 347,39%, embora este último não seja um resultado estatisticamente significativo, pode-se especular acerca da possibilidade de o genótipo XRCC3 Thr/Thr poder ser protector.

Tabela 12 – Odds ratio (OR) e Intervalos de Confiança (IC) para os parâmetros significantes no estudo da variável dependente NBUD. O OR mede o quociente entre a probabilidade de se observarem classes de maior ordem (com mais protusões nucleares) e a probabilidade de classes de menor ordem (com menos protusões nucleares) quando é do género feminino, ou quando a Exposição a formaldeído (FA) não existe, ou quando se é heterozigótico XRCC3 Thr/Met.

Parâmetro	OR	Intervalo de Confiança		%
		Limite Inferior	Limite Superior	
Género	5,643752665	1,350355066	23,58782882	464,3753
Exposição a FA	0,108992993	0,031566936	0,376326433	-89,1007
XRCC3 Thr/Met	7,1801748	1,778896825	28,98139422	618,0175

A tabela 13 apresenta como variáveis independentes significativas significativamente associadas à existência de micronúcleos na mucosa bucal, a ausência de hábitos tabágicos ($p < 0,001$) e a exposição a formaldeído ($p = 0,004$).

Tabela 13 – Micronúcleos (MN) em células da mucosa bucal. Resultados do ajuste da regressão logística quando a variável dependente tem 3 categorias de micronúcleos em células da mucosa bucal (0, 1-3, > 3 MN). O significado das colunas é o mesmo que da tabela 7.

	Estimate	Std. Error	Wald	df	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Threshold [MNboca = 0]	23,006	1,867	151,807	1	,000	19,346	26,665
[Mnboca = 1]	24,833	1,921	167,079	1	,000	21,067	28,598
Location							
Idade	,037	,026	1,962	1	,161	-,015	,088
Género Feminino	-,120	,598	,040	1	,841	-1,292	1,052
Género Masculino	0 ^a	.	.	0	.	.	.
C. tabaco nulo	21,122	1,123	353,667	1	,000	18,921	23,323
C. tabaco leve	20,196	,000	.	1	.	20,196	20,196
C. tabaco moderado	,501	,000	.	1	.	,501	,501
C. tabaco pesado	0 ^a	.	.	0	.	.	.
C. álcool nulo	,860	,872	,971	1	,324	-,850	2,569
C. álcool leve	1,572	,857	3,368	1	,066	-,107	3,251
C. álcool moderado	0 ^a	.	.	0	.	.	.
Sem Exposição FA	-1,645	,564	8,488	1	,004	-2,751	-,538
Exposição FA	0 ^a	.	.	0	.	.	.
ADH3*1/ADH3*1]	-,337	,862	,153	1	,696	-2,027	1,352
ADH3*1/ADH3*2	-1,296	,766	2,862	1	,091	-2,797	,205
ADH3*2/ADH3*2	0 ^a	.	.	0	.	.	.
XRCC3 Met/Met	-,018	,675	,001	1	,979	-1,341	1,305
XRCC3 Thr/Met	,103	,584	,031	1	,860	-1,041	1,247
XRCC3 Thr/Thr	0 ^a	.	.	0	.	.	.

Link function: Logit.

a. This parameter is set to zero because it is redundant.

Os indivíduos que não possuem hábitos tabágicos, possuem uma forte diminuição da predisposição à presença de micronúcleos na mucosa bucal, local de contacto directo do formaldeído. A não exposição a formaldeído diminui em cerca de 80,69% a predisposição a micronúcleos na mucosa bucal, como se apresenta na tabela 14.

Tabela 14 – Odds ratio (OR) e Intervalos de Confiança (IC) para os parâmetros significantes no estudo da variável dependente MN em células esfoliadas da mucosa bucal. O OR mede o quociente entre a probabilidade de se observarem classes de maior ordem (com mais micronúcleos) e a probabilidade de classes de menor ordem (com menos micronúcleos) quando a Exposição a formaldeído (FA) não existe, ou quando o consumo de tabaco é nulo (tabaco = 0).

Parâmetro	OR	Intervalo de Confiança		%
		Limite Inferior	Limite Superior	
Tabaco = 0	1490118294	164887715,7	13466452136	1,49012E+11
Exposição a FA	0,193097017	0,063869117	0,583794794	-80,69029825

5. DISCUSSÃO DE RESULTADOS

Devido ao elevado potencial genotóxico do formaldeído, a elevada exposição a este sugere riscos ocupacionais a trabalhadores com exposição prolongada. Neste estudo, todas as variáveis dependentes – micronúcleos em linfócitos periféricos, pontes nucleoplásmicas, protusões nucleares e micronúcleos em células da mucosa bucal, apresentaram uma associação estatisticamente significativa com a exposição a formaldeído. Assim, a exposição a formaldeído consiste num factor de risco que actua no aumento de todos os biomarcadores genotóxicos propostos neste estudo (tabela 5).

O dano nos cromossomas e os efeitos nos linfócitos podem ser causados cumulativamente pelo facto do formaldeído escapar do primeiro local de contacto originando alterações nucleares nos linfócitos periféricos dos indivíduos expostos a formaldeído [12].

Os resultados obtidos para os linfócitos periféricos demonstram (tabelas 7 e 8), tal como o estudo de Ye *et al.* [55], que os linfócitos podem ser afectados em situações de exposição a longo prazo. Estes resultados sugerem que existe potencial dano genotóxico em indivíduos com exposições a longo prazo a concentrações elevadas de formaldeído.

Os efeitos genotóxicos locais após exposição a formaldeído têm sido claramente demonstrados em estudos experimentais com animais, através da formação de ligações cruzadas DNA-proteína, aberrações cromossómicas estruturais e células aberrantes. Em humanos existe um aumento da frequência de micronúcleos em células da mucosa bucal e nasal [18]. Estudos realizados por Titenko Holland *et al.* e Burgaz *et al.* demonstraram que as frequências de micronúcleos são maiores em células do epitélio bucal após exposição a formaldeído [56, 57], tal como neste estudo em que se verifica uma associação

estatisticamente significativa entre a presença de micronúcleos na mucosa bucal e a exposição a formaldeído (tabelas 13 e 14).

Estudos sugerem que os polimorfismos genéticos em genes específicos podem afectar o nível de dano nos cromossomas associado a exposições ambientais a agentes genotóxicos. Os polimorfismos genéticos são potencialmente importantes na formação de micronúcleos, dependendo da exposição, material biológico examinado e etnicidade da população estudada [15]. Os indivíduos expostos a formaldeído em contexto ocupacional, têm exposições frequentes, isto é, repetidas por longos períodos de tempo. Desta forma, esta exposição “crónica” pode conduzir a acumulações de dano no DNA e, conseqüentemente, aumento do risco de mutações [10].

A instabilidade cromossómica tem sido associada à mutação no gene XRCC3 e em outros genes envolvidos na reparação da recombinação de homólogos [38]. Evidências biológicas e bioquímicas indicam um papel directo do gene XRCC3 na reparação das quebras de cadeias duplas. Dados funcionais também sugerem que o polimorfismo XRCC3 Thr241Met pode estar associado, mas não de forma significativa, a uma diminuição da capacidade de reparação de DNA. Desta forma, parece razoável considerar o polimorfismo no gene XRCC3 como candidato de baixa penetrância na etiologia de cancro [38]. Apesar de existirem estudos em que não foi observada influência dos genótipos do XRCC3 na frequência basal de micronúcleos [58], neste estudo verificou-se uma associação estatisticamente significativa entre o genótipo XRCC3 Thr/Met e a presença de protusões nucleares. Este resultado vem de encontro a relatos de que os heterozigóticos XRCC3 Thr/Met apresentam maiores quebras de cromátídeos em fumadores e trocas de cromátídeos-irmãos [14] e que os portadores da variante do alelo Thr241Met possuem elevados níveis de aductos de DNA em linfócitos, indicando que este polimorfismo está associado a baixa capacidade de reparação de DNA e que pode aumentar o risco de vários cancros [40, 59].

A existência de baixa expressão ou baixa actividade enzimática da ADH3 possui provavelmente um impacto a nível da defesa contra o stress causado pelo formaldeído em tecidos com exposição directa à toxicidade deste agente químico como, por exemplo, o epitélio oral. Apesar de Hedberg (2001), referir que síntese ou actividade diminuída da proteína ADH3 poder aumentar o dano genético derivado da exposição e, combinada com o tabaco, aumentar potencialmente o risco de cancro na cavidade oral de fumadores, este resultado não se observou neste trabalho. No entanto, foi determinada uma associação de protecção estatisticamente significativa com o genótipo ADH3*1/ADH3*2, relativamente ao homozigótico ADH3*2/ADH3*2, em micronúcleos de linfócitos periféricos. Segundo o estudo de *Drenthet al.* (2001), a presença de alelos heterozigóticos possui um papel protector, corroborando este resultado [47].

Em estudos epidemiológicos, é importante avaliar a influência de factores de confundimento na associação entre doença (*lato sensu*) e exposição, tais como o género, a idade, hábitos tabágicos e alcoólicos.

Neste trabalho não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre género feminino e masculino relativamente à frequência de micronúcleos, pontes nucleoplásmicas e micronúcleos em células esfoliadas da boca, apenas nas protusões nucleares, confirmando estudos de Fenech *et al.* (1999) e Wojda *et al.* (2007), demonstrando que o género feminino apresenta entre 1,2 e 1,6 vezes mais micronúcleos do que o género masculino, [60, 61].

Tem sido postulado que a idade diminui a capacidade da metabolização de xenobióticos, bem como a indução de enzimas envolvidas no metabolismo [61] aumentando progressivamente a instabilidade cromossómica e a perda de eficiência em mecanismos de reparação de DNA, resultando na acumulação de lesões genéticas [60]. Neste estudo, a idade, foi estatisticamente associada apenas ao número de micronúcleos em linfócitos periféricos. Assim, por cada 1 ano de idade a mais, existe um aumento da predisposição em 6,24% para a presença de micronúcleos em linfócitos periféricos (tabelas 7 e 8).

O fumo do tabaco tem sido epidemiologicamente associado a um aumento de risco de cancro, em especial na cavidade oral, laringe e pulmões, os quais contactam directamente com alguns componentes do fumo do cigarro. Este estudo detectou maior frequência de micronúcleos em células esfoliadas da boca em fumadores, comparativamente a não fumadores (tabelas 13 e 14), corroborando o estudo realizado por Speit *et al.* (2006) [56]. Este resultado é facilmente justificável pelo facto do fumo do tabaco, classificado como carcinogénico, contactar directamente com a mucosa bucal.

Apesar de outros estudos [62, 63] reportarem um aumento do número de micronúcleos em linfócitos, pontes nucleoplásmicas e protusões nucleares devido à nitrosamina derivada da nicotina (NNK), neste estudo não se verificaram quaisquer associações entre hábitos tabágicos e as referidas alterações nucleares. Todavia, no estudo realizado por Bonassi *et al.* [64] que utilizou os dados do projecto HUMN, é referido que indivíduos não fumadores ou fumadores com um consumo tabágico inferior, não apresentam alterações significativas. De forma geral, o efeito do fumo do tabaco na frequência de alterações nucleares permanece algo controverso.

O álcool é reconhecidamente um dos agentes que influenciam de forma genotóxica as células, sendo citado como um forte agente potenciador do desencadeamento de lesões cancerígenas [65]. Neste estudo detectaram-se associações estatisticamente significativas entre a frequência de pontes nucleoplásmicas e o consumo leve de bebidas alcoólicas. O consumo leve de álcool é também classificado como social. A explicação para o resultado que o consumo leve de álcool confere protecção (tabelas 10 e 11) pode dever-se ao facto da

maioria dos sujeitos participantes no estudo, especialmente os não expostos a formaldeído, terem sido classificados como consumidores leves. Relativamente a associação entre frequência de micronúcleos e consumo de álcool, esta não foi observada, corroborando o estudo de Stich & Rosin (1983), que referem ausência de diferenças estatisticamente significativas na frequência de micronúcleos em indivíduos que consumiam bebidas alcoólicas [66].

6. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Nos estudos de genotoxicidade ambiental, deve-se ter em conta uma perspectiva holística onde se tem em consideração a interacção entre exposição ocupacional a agentes genotóxicos, hábitos de vida, nomeadamente ambientais e alimentares, e o *background* genético.

A resposta individual pode variar de acordo com várias condições, tais como: absorção e metabolismo do genotóxico, reparação de DNA, morte celular (apoptose, necrose), controlo do ciclo celular e resposta imunológica. A formação de micronúcleos em células em divisão é o resultado da quebra de cromossomas devido a lesões não reparadas ou mal reparadas ou mal segregação de cromossomas devido a disfunções mitóticas. Estes eventos podem ser induzidos por stress oxidativo, exposição a clastogénios ou aneugénios, defeitos genéticos no *checkpoint* do ciclo celular e/ou genes reparadores de DNA e ainda por deficiências em nutrientes necessários como co-factores no metabolismo do DNA e segregação de cromossomas [15].

O efeito dos polimorfismos genéticos na formação de micronúcleos, e outras alterações nucleares, é complexo, sendo influenciado em larga extensão por polimorfismos em genes de proteínas, envolvidas no metabolismo de xenobióticos, proteínas reparadoras de DNA e enzimas envolvidas no metabolismo do folato. Esta heterogeneidade reflecte a presença de múltiplas exposições internas e externas e o número de alterações cromossómicas que eventualmente resultarão na formação de micronúcleos [15]. Os biomarcadores de susceptibilidade individual contribuem de forma significativa para vários níveis de risco [67]. Deve-se considerar sempre que muitos outros genes estão envolvidos na reparação do dano no DNA e que pode existir a possibilidade de estes polimorfismos poderem estar num desequilíbrio de *linkage* relativamente a outros factores causais [45].

O teste dos micronúcleos em células epiteliais esfoliadas tem sido utilizado em vários estudos de biomonitorização de efeitos genotóxicos após exposições ocupacionais e ambientais. É esperado que o teste dos micronúcleos em células epiteliais seja um biomarcador específico de local de exposição a agentes genotóxicos e de risco de cancro, sendo uma ferramenta útil no estabelecimento de limites de exposição a substâncias genotóxicas em humanos [56]. Para além disso, a obtenção de células epiteliais da boca

recorre a um método menos invasivo comparativamente com a colheita de sangue para estudo dos linfócitos [68].

Em conclusão, este estudo fornece evidência inequívoca para associação entre a exposição ocupacional a formaldeído e a presença de alterações nucleares, quer a nível dos linfócitos periféricos quer das células da mucosa bucal, sendo este o factor de risco transversal a todas as alterações nucleares. Algumas das variáveis referentes aos estilos de vida, como os hábitos tabágicos e o consumo de álcool, exercem efeitos significativos na presença de micronúcleos na mucosa bucal, pontes nucleoplásmicas e protusões nucleares. Relativamente aos factores genéticos, verificaram-se associações estatisticamente significativas entre o polimorfismo do gene da ADH3 e presença de micronúcleos em linfócitos periféricos e do polimorfismo do gene XRCC3 nas protusões nucleares.

Uma das maiores dificuldades no desenho de possíveis associações entre polimorfismos e efeitos é a necessidade de grandes amostras, especialmente para estudos de alelos raros ou interacções gene-gene ou gene-ambiente [69]. Uma vez que os resultados aqui apresentados se baseiam numa amostra pequena, devem ser realizados estudos com uma dimensão maior, de forma a confirmar estes resultados e explicar a influência putativa dos polimorfismos, quer em genes reparadores de DNA como em enzimas metabólicas, no dano cromossómico [15].

A instabilidade genética criada pela perda esporádica de mecanismos de resposta ao dano infligido no DNA é muito importante na iniciação e/ou progressão de cancro. Não existe dúvida que os tumores possuem grande número de alterações genéticas e que a sucessão destas alterações é necessária para culminar num processo cancerígeno. Desta forma, é de incalculável interesse estudar os mecanismos celulares que conduzem a alteração genética e, em particular, a instabilidade genética [70].

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] – T. Orsière, I. Sari-Minodier, G. Iarmarcovai, A. Botta, Genotoxic risk assessment of pathology and anatomy laboratory workers exposed to formaldehyde by use of personal air sampling and analysis of DNA damage in peripheral lymphocytes, *Mutation Research* 605 (2006) 30 – 41.
- [2] – M. Fenech, Chromosomal biomarkers of genomic instability relevant to cancer, *Drug Discovery Today* 22 (2002) 1128-1137.
- [3] – W. Au, Usefulness of biomarkers in population studies: From exposure to susceptibility and to prediction of cancer, *Int. J. Environ. Health* 210 (2007) 239-246.
- [4] – Waterfield, C. & Timbrell, J. (1999). Biomarkers – An Overview. Em B. Ballantyne, T. Marrs & T. Syversen (Eds.), *General and Applied Toxicology*. Stockton Press.
- [5] – S. Viegas, J. Prista, Cancro Nasofaríngeo e Exposição a Formaldeído: avaliação da história profissional em 63 casos registados, *Soc. Portuguesa de Medicina do Trabalho* 6 (2007) 13 – 22.

- [6] – M. Pala, D. Ugolini, M. Ceppi, F. Rizzo, L. Maiorana, C. Bolognesi, T. Schilirò, G. Gilli, P. Bigatti, R. Bono, D. Vecchio, Occupational exposure to formaldehyde and biological monitoring of Research Institute workers, *Cancer Detection and Prevention* 32 (2008) 121 – 126.
- [7] – S. Herausgegeben, U. Bernauer, H. Mielke, U. Herbst, H.-B., Richter-Reichhelm, K.-E. Appel, U. Gundert-Remy, Assessment of the carcinogenicity of formaldehyde [CAS No. 50-00-0]. Berlin: Bundesinstitut für Risikobewertung – BfR, 2006.
- [8] – S. J. Franks, A mathematical model for the absorption and metabolism of formaldehyde vapour by humans, *Toxicology and Applied Pharmacology* 206 (2005) 309 – 320.
- [9] – C. Conaway, J. Whysner, L. Verna, G. Williams, Formaldehyde mechanistic data and risk assessment: endogenous protection from DNA adduct formation, *Pharmacol. Ther.* 71 (1996) 29 – 55.
- [10] – L. Zhang, C. Steinmaus, D. Eastmond, X. Xin, M. Smith, Formaldehyde exposure and leukemia: a new meta-analysis and potential mechanisms, *Mutation Research* 681 (2009) 150 - 168.
- [11] – G. Speit, P. Schütz, J. Högel, O. Schmid, Characterization of the genotoxic potential of formaldehyde in V79 cells, *Mutagenesis* 22 (6) (2007) 387 – 394.
- [12] – X. Ye, W. Yan, H. Xie, M. Zhao, C. Ying, Cytogenetic analysis of nasal mucosa cells and lymphocytes from high-level long-term formaldehyde exposed workers and low-level short-term exposed waiters, *Mutation Research* 588 (2005) 22-27.
- [13] – M. Vine, Biological markers: their use in quantitative assessments, *Adv Dent Res* 8 (1) (1994), 92-99.
- [14] - J. Tuimala, G. Szekely, H. Wikman, H. Järventaus, A. Hirvonen, S. Gundy, H. Norppa, Genetic polymorphisms of DNA repair and xenobiotic-metabolizing enzymes: effects on levels of sister chromatid exchanges and chromosomal aberrations, *Mutation Research* 554 (2004) 319-33.
- [15] – G. Iarmarcovai, S. Bonassi, A. Botta, R.A. Bann, T. Orsière, Genetic polymorphisms and micronucleus formation: A review of the literature, *Mutation Research* 658 (2008) 215 – 233.
- [16] – R. Mateuca, N. Lombaert, P. Aka, I. Decordier, M. Kirsch-Volders, Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring, *Biochimie* 88 (2006) 1515-1531.
- [17] – H. Lindeberg, X. Wang, H. Järventaus, G. Falck, H. Norppa, M. Fenech, Origin of nuclear buds and micronuclei in normal and folate-deprived human lymphocytes, *Mutation Research* 617 (2007) 33–45.
- [18] – G. Speit, O. Schmid, M. Fröhler-Keller, I. Lang, G. Triebig, Assessment of local genotoxic effects of formaldehyde in humans measured by the micronucleus test with exfoliated buccal mucosa cell, *Mutation Research* 627 (2007) 129-131.
- [19] – L. Serrano-García, R. Montero-Montoya, Micronuclei and Chromatid Buds are result of related genotoxic events, *Environmental and Molecular Mutagenesis* 38 (2001) 38 – 45.
- [20] – D. Hoffelder, L. Luo, N. Burke, S. Watkins, S. Gollin, W. Saunders, Resolution of anaphase bridges in cancer cells, *Chromosoma* 112 (2004) 389 – 397.
- [21] – K. Umegaki, M. Fenech, Cytokinesis-block micronucleus assay in WIL2-NS cells: a sensitive system to detect chromosomal damage induced by reactive oxygen species and activated human neutrophils, *Mutagenesis* 15(3) (2000) 261-269.

- [22] – M. Fenech, Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a “cytome” assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death, *Mutation Research* 600 (2006) 58-66.
- [23] – M. Fenech, The Genome Health Clinic and Genome Health Nutrigenomics concepts: diagnosis and nutritional treatment of genome and epigenome damage on an individual basis, *Mutagenesis*, 20 (2005) 225 – 269.
- [24] – P. Thomas, K. Umegaki, M. Fenech, Nucleoplasmic bridges are a sensitive measure of chromosome rearrangement in the cytokinesis-block micronucleus assay, *Mutagenesis* 18 (2003) 187– 194.
- [25] – K. Utani, J. Kawamoto, N. Shimizu, Micronuclei bearing acentric extrachromosomal chromatin are transcriptionally competent and may perturb the cancer cell phenotype, *Mol. Cancer Res.* 5 (2007) 695 – 704.
- [26] – M. Kirsh-Volders, R. Mateuca, M. Roelants, A. Tremp, E. Zeiger, S. Bonassi, N. Holland, W. Chang, P. Aka, M. DeBoeck, L. Goddenis, V. Haufroid, H. Ishikawa, B. Laffon, R. Marcos, L. Migliore, H. Norppa, J. Teixeira, A. Zijno, M. Fenech, The effects of GSTM1 and GSTT1 polymorphisms on micronucleus frequencies in Human Lymphocytes in vivo, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15 (5) (2006) 1038-1042.
- [27] – M. Fenech, N. Holland, W. Chang, E. Zeiger, S. Bonassi, The Human MicroNucleus Project – An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans, *Mutation Research* 428 (1999) 271-283.
- [28] – M. Fenech, Biomarkers of genetic damage for cancer epidemiology, *Toxicology* 181 (2002) 411-416.
- [29] – M. Fenech, The in vitro micronucleus technique, *Mutation Research* 455 (200) 81-95.
- [30] – S. Bonassi, A. Znaor, M. Ceppi, C. Lando, W. Chang, N. Holland, M. Kirsch-Volders, E. Zeiger, S. Ban, R. Barale, M. Bigatti, C. Bolognesi, A. Cebulska-Wasilewska, E. Fabianova, A. Fucic, L. Hagmar, G. Joksic, A. Martelli, L. Migliore, E. Mirkova, M. Scarfi, A. Zijno, H. Norppa, M. Fenech, An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans, *Carcinogenesis*, 28 (3) (2007) 625-631.
- [31] – L. Brooks, SNPs: Why do we care? Methods in Molecular Biology, vol. 212: Single Nucleotide Polymorphisms: Methods and Protocols. Edited by: P-Y. Kwok. Humana Press Inc., Totowa, NJ.
- [32] – D. Crawford, D. Akey, D. Nickerson, The patterns of natural variation in human genes, *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet* 6 (2005) 287-312.
- [33] – S. Pavanello, E. Clonfero, Biological indicators of genotoxic risk and metabolic polymorphisms, *Mutation Research* 463 (2000) 285-308.
- [34] – R. Tebbs, Y. Zhao, J. Tucker, J. Scheerer, M. Siciliano, M. Hwang, N. Liu, R. Legerski, L. Thompson, Correction of chromosomal instability and sensitivity to diverse mutagens by a cloned cDNA of the XRCC3 DNA repair gene, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92 (1995) 6354-6358.
- [35] – Y. Wang, D. Liang, M. Spitz, K. Zhang, Q. Dong, C. Amos, X. Wu, XRCC3 genetic polymorphism, smoking, and lung carcinoma risk in minority populations, *Cancer* 8 (2003) 1701-1706.
- [36] – E. Goode, C. Ulrich, J. Potter, Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11 (2002) 1513-1530.

- [37] – M. Berwick, P. Vineis, Markers of DNA repair and susceptibility to cancer in humans: an epidemiologic review, *Journal of the National Cancer Institute*, 11 (2000) 874-897.
- [38] – M. Brenneman, A. Weiss, J. Nickoloff, D. Chen, XRCC3 is required for efficient repair of chromosome breaks by homologous recombination, *Mutation Research* 459 (2000) 89-97.
- [39] – X. Cui, M. Brenneman, J. Meyne, M. Oshimura, E. Goodwin, D. Chen, The XRCC2 and XRCC3 repair genes are required for chromosome stability in mammalian cells, *Mutation Research* 434 (1999) 75-88.
- [40] – S. Han, H-T. Zhang, Z. Wang, Y. Xie, R. Tang, Y. Mao, Y. Li, DNA repair gene XRCC3 polymorphisms and cancer risk: a meta-analysis of 48 case-control studies, *European Journal of Human Genetics* 14 (2006) 1136-1144.
- [41] – M. Manuguerra, F. Saletta, M. Karagas, M. Berwick, F. Veglia, P. Vineis, G. Matullo, XRCC3 and XPD/ERCC2 single nucleotide polymorphisms and the risk of cancer: a HuGE review, *American Journal of Epidemiology* (2006) 1-6.
- [42] – A. Pierce, R. Johnson, L. Thompson, M. Jasin, XRCC3 promotes homology-directed repair of DNA damage in mammalian cells, *Genes & Development* 13 (1999) 2633-2638.
- [43] – A. Lindh, S. Ruffi, N. Schultz, A. Cox, T. Helleday, Mitotic defects in XRCC3 variants T241M and D213N and their relation to cancer susceptibility, *Human Molecular Genetics* 7 (2006) 1217-1224.
- [44] – G. Iarmarcovai, I. Sari-Minodier, F. Chaspoul, C. Botta, M. De Méo, T. Orsière, J.L. Bergé-Lefranc, P. Gallice, A. Botta, Risk assessment of welders using analysis of eight metals by ICP-MS in blood and urine and DNA damage evaluation by the comet and micronucleus assays; influence of XRCC1 and XRCC3 polymorphisms, *Mutagenesis* 6 (2005) 425-432.
- [45] – J. Figueiredo, J. Knight, L. Briollais, I. Andrulis, H. Ozcelik, Polymorphisms XRCC1-R399Q and XRCC3- T241M and the risk of breast cancer at the Ontario site of the breast cancer family registry, *Cancer Epidemiol Biomarker Prev* 13 (4) (2004) 583-591.
- [46] – W. Wu, P. Navasumrit, M. Ruchirawat, Use of biomarkers to characterize functions of polymorphic DNA repair genotypes, *Int. J. Hyg. Environ. Health* 207 (2004) 301-313.
- [47] – H. Cichoz-Lach, J. Partycka, I. Nesina, K. Celinski, M. Slomka, J. Wojcierowski, Genetic polymorphism of alcohol dehydrogenase 3 in alcohol liver cirrhosis and in alcohol chronic pancreatitis, *Alcohol & Alcoholism* (2005) 1-4.
- [48] – A. Groppi, J. Begueret, A. Iron, Improved methods for genotype determination of human alcohol dehydrogenase (ADH) at ADH2 and ADH3 loci by using polymerase chain reaction-directed mutagenesis, *Clinical Chemistry* 10 (1990) 1785-1768.
- [49] – M. Osier, A. Pakstis, J. Kidd, J. Lee, S. Yin, H-C. Ko, H. Edenberg, R.B. Lu, K. Kidd, Linkage disequilibrium at the ADH2 and ADH3 loci and risk of alcoholism, *Am. J. Hum. Genet.* 64 (1999) 1147-1157.
- [50] – S. Fustinoni, L. Soleo, M. Warholm, P. Begemann, A. Rannug, H-G. Neumann, J. Swenberg, L. Vimercati, V. Foà, A. Colombi, Influence of metabolic genotypes on biomarkers of exposure to 1,3-butadiene in humans, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11 (2002) 1082-1090.
- [51] – A. Yokoyama, T. Omori, Genetic polymorphism of alcohol and aldehyde dehydrogenases and risk for esophageal and head and neck cancers, *J Clin Oncol* 33 (2003) 111-121

- [52] – Hedberg, J. (2001). Function, expression and polymorphism of Human Alcohol Dehydrogenase 3/Glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase. Stockholm: Karolinska Institute.
- [53] – Fortin, M. (1996). O Processo de investigação – da concepção à realização. Lisboa: Lusociência.
- [54] – P. Tolbert, C. Shy, J. Allen, Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: a field test in snuff users, *American Journal of Epidemiology* 8 (1991) 840 – 850.
- [55] – X. Ye, W. Yan, M. Zhao, C. Ying, Cytogenetic analysis of nasal mucosa cells and lymphocytes from high-level long-term formaldehyde xposed workers and low-level short-term exposed waiters, *Mutation Research* 588 (2005) 22-27.
- [56] – G. Speit, O. Schmid, Local genotoxic effects of formaldehyde in humans measured by the micronucleus test with exfoliated epithelial cells, *Mutation Research* 613 (2006) 1-9.
- [57] – S. Burgaz, O. Erdem, G. Çakmak, A. Karakaya, Cytogenetic analysis of buccal cells from shoe-workers and pathology and anatomy laboratory workers exposed to n-hexane, toluene, methyl ethyl ketone and formaldehyde, *Biomarkers* 2 (2002) 151-161.
- [58] – G. Iarmarcovai, I. Sari-Minodier, T. Orsière, M. De Méo, P. Gallice, C. Bideu, D. Iniesta, J. Pompili, J.L. Bergé-Lefranc, A. Botta, A combined analysis of XRCC1, XRCC3, GSTM1 and GSTT1 polymorphisms and centrome content of micronuclei in welders, *Mutagenesis* 2 (2006) 159-165.
- [59] – s. Benhamou, J. Tuimala, C. Bouchardy, P. Dayer, A. Sarasin, A. Hirvonen, DNA repair gene XRCC2 and XRCC3 polymorphisms and susceptibility to cancers of the upper aerodigestive tract, *Int. J. Cancer* 112 (2004) 901-904.
- [60] – M. Fenech, N. Holland, W. Chang, E. Zeiger, S. Bonassi, The Human MicroNucleus Project – An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans, *Mutation Research* 428 (1999) 271 – 283.
- [61] – A. Wojda, E. Zietkiewicz, M. Witt, Effects of age and gender on micronucleus and chromosome nondisjunction frequencies in centenarians and younger subjects, *Mutagenesis Advance Access* (2007) 1 – 6.
- [62] – R. El-Zein, M. Schabath, C. Etzel, M. Lopez, J. Franklin, M. Spitz, Cytokinesis-Blocked Micronucleus Assay as a Novel Biomarker for Lung Cancer Risk, *Cancer Res.* 66 (2006) 6449 – 6456.
- [63] - R. El-Zein, M. Fenech, M. Lopez, M. Spitz, C. Etzel, Cytokinesis-Blocked Cytome Assay Biomarkes Identify Lung Cancer Cases amongst Smokers, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev* 17 (2008) 1111 – 1119.
- [64] - S. Bonassi, M. Neri, C. Lando, M. Ceppi, Y. Lin, W. Chang, N. Holland, M. Kirsch-Volders, E. Zeiger, M. Fenech, Effect of smoking habit on the frequency of micronuclei in human lymphocytes: results from the Human MicroNucleus project, *Mutation Research* 543 (2003) 155-166.
- [65] – A. Ramirez, P. Saldanha, Micronucleus investigation of alcoholic patients with oral carcinoma, *Genetics and Molecular Research* 1 (2002), 246 – 260.
- [66] – H. Stich, M. Rosin, Quantitating the synergistic effect of smoking and alcohol consumption with the micronucleus test on human buccal mucosa cells, *Int. J. Cancer* 31 (1983), 305 – 308.

- [67] – R. Their, T. Brüning, P. Roos, K. Golka, Y. Ko, H. Bolt, Markers of genetic susceptibility in human environmental hygiene and toxicology: the role of selected CYP, NAT and GST genes, *International Journal of Hygiene Environmental Health* 206 (2003) 149-171.
- [68] – N. Holland, C. Bolognesi, M. Kirsch-Volders, S. Bonassi, E. Zeiger, S. Knasmueller, M. Fenech, The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: The HUMN project perspective on current status and knowledge gaps, *Mutat. Res.: Rev. Mutation Research* (2008), doi: 10.1016/j.mrrev.2008.03.007.
- [69] – R. Mateuca, M. Roelants, G. Iarmarcovai, P. Aka, L. Godderis, A. Tremp, S. Bonassi, M. Fenech, J-L. Bergé-Lefranc, M. Kirsch-Volders, hOGG1³²⁶, XRCC1³⁹⁹ and XRCC3²⁴¹ polymorphisms influence micronucleus frequencies in human lymphocytes in vivo, *Mutagenesis* 1 (2008) 35-41.
- [70] – J. Thacker, The RAD51 gene family, genetic instability and cancer, *Cancer Letters* 219 (2005) 125-135.

ANEXO I

Questionário

QUESTIONÁRIO

Secção I – Identificação

1.1. Género: M F

1.2. Idade:

1.3. Nome: _____
(Apenas para identificação da exposição)

Secção II – Historial Social

2.1. Carga tabágica

- Fuma ou alguma vez fumou? Sim Não

- Se sim, com que idade começou a fumar regularmente? _____ anos

- Continua a fumar? Sim Quantos cigarros por dia? _____

Não Quando parou de fumar? _____

2.2. Consumo de álcool

Com que frequência consome álcool? _____

Qual a quantidade que consome? _____

2.3. Hábitos alimentares

Assinale com uma cruz (X) a frequência diária com que consome os seguintes alimentos:

Alimentos	Nunca	Inferior a 1 vez por semana	1 a 2 vezes por semana	3 a 4 vezes por semana	Mais de 5 vezes por semana
Carnes brancas (perú, frango)					
Carnes vermelhas (vaca, porco)					
Fígado					
Alface					
Cereais integrais					
Pão					
Frutas cítricas (laranja, limão, morango, tangerina, pêsego)					

Alimentos	Nunca	Inferior a 1 vez por semana	1 a 2 vezes por semana	3 a 4 vezes por semana	Mais de 5 vezes por semana
Frutas não cítricas (pêra, maçã, banana)					
Frutos secos (amendoins)					
Peixe					

Secção III – Historial Ocupacional

3.1. Presente Ocupação

Área de Trabalho: _____

Função exercida: _____

Função exercida há ____ anos

Descrição do tipo de trabalho:

Tempo de actividade na empresa: _____ (anos)

Existe exposição ao formaldeído no seu posto de trabalho? Sim Não

Se sim passe para o ponto 3.2.

Se não passe para o ponto 3.3.

3.2. Exposição ao formaldeído no local de trabalho

3.2.1. Ocupações ou actividades exercidas actualmente com exposição ao formaldeído.

	Função exercida	Horas por dia	Dias por semana
1			
2			
3			

3.2.2. Ocupações ou actividades exercidas anteriormente com exposição ao formaldeído

	Função exercida	Horas por dia	Dias por semana	De... a (anos)
1				
2				
3				
4				

3.3. Exposição a outros produtos no local de trabalho

Considera estar exposto a algum destes produtos?

- Fenol
- Metanol
- Ácido acético
- Soda cáustica
- Ácido clorídrico
- Hipoclorito de sódio (lixívia)
- Partículas

Secção IV – Susceptibilidade individual

4.1. Tem, ou teve, alguma doença respiratória? Sim Não

Se sim, qual? _____

Toma alguma medicação? Sim Não

Se sim, qual? _____

4.2. Tem, ou teve, alguma dificuldade respiratória? Sim Não

Se sim, qual? _____

Toma alguma medicação? Sim Não

Se sim, qual? _____

4.3. Tem, ou teve, alguma doença oncológica? Sim Não

Se sim, qual? _____

Toma alguma medicação? Sim Não

Se sim, qual? _____

4.4 Existem doenças oncológicas em familiares directos?

Sim Não

Se sim, quais? _____

4.5. Toma algum suplemento alimentar?

Sim Não

Se sim, quais? _____

4.6. Toma presentemente algum dos seguintes medicamentos?

Sim Não

Se sim, quais?

Folifer

Neurobion

Folacin

Outro _____

Secção V – Equipamento de Protecção Colectiva

Existem medidas de protecção colectiva? Sim Não

Se sim, quais?

Sistema de exaustão de ar? Sim Não

Sistema de insuflação de ar? Sim Não

Sistema de climatização? Sim Não

Secção VI – Equipamento de Protecção Individual

Utiliza equipamento de protecção individual? Sim Não

Se sim, especifique:

Botas de protecção: Sim Não

Luvas: Sim Não

Máscara das vias respiratórias: Sim Não

Óculos de protecção: Sim Não

Vestuário adequado: Sim Não

Protectores auriculares: Sim Não

Capacete: Sim Não

Secção VII – Tempos Livres

Que tipo de actividades desenvolve para além da sua actividade profissional?

ANEXO II

Consentimento Informado

TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO

A Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa encontra-se a desenvolver um projecto de investigação com o tema: “Caracterização da Exposição ao Formaldeído e Conhecimento dos Eventuais Efeitos na Saúde”.

Este projecto tem como objectivos primordiais a caracterização da exposição deste agente químico em diversas situações de trabalho, bem como a investigação de eventuais efeitos genotóxicos.

De modo à concretização dos nossos objectivos, pretendemos recolher amostras de sangue periférico e tecido epitelial do interior da cavidade bucal a indivíduos expostos profissionalmente a formaldeído.

A metodologia a utilizar é a referenciada por diversos autores, que tem como objectivo analisar detalhadamente a exposição dos trabalhadores ao formaldeído e, conseqüentemente, contribuir para minimizar essa exposição.

Acresce-se que a **privacidade** assim como a completa **confidencialidade** dos dados obtidos será assegurada.

Se tiver alguma dúvida poderá esclarece-la com as responsáveis pelo projecto. Obrigada pela atenção e disponibilidade.

Eu, _____
(preencha com o seu nome completo), dou o meu consentimento livre e informado, para participar na realização da colheita acima referidas, autorizando posterior uso e publicação dos dados.

Data ___/___/___

Assinatura
